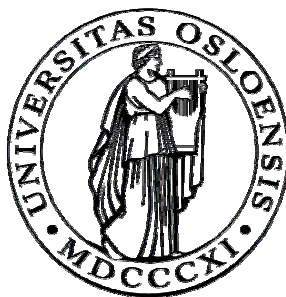


**Tilstandsavhengig vertikalfordeling hos
Pareuchaeta norvegica og utprøving av
molekylærbiologiske metoder for
identifisering av fekalpelletinnhold**

Hege Vestheim

Cand. scient. thesis



**Universitetet i Oslo
Biologisk Institutt
Avdeling for marinbiologi og limnologi
Høsten 2003**

Innholdsfortegnelse

1 Innledning	4
1.1 Døgnlig vertikal vandring og vertikal fordeling hos zooplankton	4
1.2 Den karnivore copepoden <i>Pareuchaeta norvegica</i> (Crustacea)	4
1.3 Undersøkelse av fødesammensetning hos zooplankton	6
1.3.1 Tradisjonelle metoder	6
1.3.2 DNA-analyse av fekalpelleter – artsspesifikk PCR	7
1.4 Målet med oppgaven	7
2 Materiale og metode	8
2.1 Lokaltet og innsamlingsperiode	8
2.2 Miljøparametrer	8
2.3 Byttedyr	8
2.4 <i>Pareuchaeta norvegica</i>	9
2.4.1 Innsamling og inkubering	9
2.4.2 Lengde- og vektmaalinger	10
2.4.3 Kartlegging av pigmentering	11
2.4.4 Statistikk	11
2.5 DNA-analyse	12
2.5.1 Økologiske aspekter	12
2.5.2 Mitokondrielt cytochrome c oxidase subunit 1-DNA (mtCOI)	13
2.5.3 DNA-sekvensbestemming for <i>Pareuchaeta norvegica</i> og potensielle byttedyr	13
2.5.4 Utforming av artsspesifikke primere	14
2.5.5 PCR på PCR-produkt (nested PCR)	16
2.5.6 DNA-undersøkelse av pelleter	16
2.5.7 Laboratoriemateriell og kjemikalier	16
2.5.8 PCR-protokoller	17
2.5.9 Kontroll av PCR-produktet	18
3 Resultater	19
3.1 Miljøparametrer - CTD-profiler	19
3.2 Byttedyr	20
3.3 Vertikalfordeling <i>Pareuchaeta norvegica</i>	22
3.3.1 Vertikalfordelingen vår	22

3.3.2 Vertikalfordelingen høst.....	22
3.4 Kondisjonsparametre.....	27
3.4.1 Prosomlengde	27
3.4.2 Tørrvekt.....	27
3.4.3 Tørrvekt/total lengde-forhold.....	28
3.4.4 Fettsekkmålinger	28
3.4.5 Vår vs høst.....	32
3.5 Pelletproduksjon.....	32
3.6 Molekylær analyse	34
3.6.1 Sekvenssammenligninger.....	34
3.6.2 Diskriminering mellom calanoide copepoder ved bruk av artsspesifikk PCR.....	38
3.6.3 Analyse av fekalpelleter	40
4 Diskusjon.....	41
4.1 Vertikal fordeling av <i>Pareuchaeta norvegica</i>	41
4.1.1 Vertikalt fordelingsmønster i lys av innsamlingsmetode.....	41
4.1.2 Vertikalt fordelingsmønster i lys av hydrografiske parametre.....	41
4.1.3 Døgnvandring.....	42
4.1.4 Vertikal fordeling i forhold til føde.....	43
4.1.6 Vertikal fordeling i lys av modenhetsgrad og livsstadium.....	43
4.1.7 Vertikal fordeling i lys av kondisjon.....	44
4.1.8 Vertikal fordeling i forhold til pigmenteringsgrad.....	46
4.2 Fødeaktivitet.....	47
4.2.1 Pelletproduksjon som estimat for fødeaktivitet – metodiske vurderinger.....	47
4.2.2 Pelletproduksjon som funksjon av tid og dyp	48
4.3 Analyse av fekalpelleter ved bruk av artsspesifikk PCR	49
4.3.1 Tolking av negative resultater	49
4.3.2 Kvantitative forhold	50
4.3.3 Alignmentet og cytochrome oxidase-c subunit I.....	50
4.3.4 Utforming av artsspesifikke primere.....	51
4.3.5 Framtidige perspektiver.....	52
Sammendrag	55
Referanser	56
Vedlegg	I

1 Innledning

1.1 Døgnlig vertikal vandring og vertikal fordeling hos zooplankton

Døgnlig vertikal vandring (Diel vertical migration - DVM) forekommer hos en rekke zooplankton, både marine- og ferskvannsarter. Det normale bevegelsesmønsteret innebærer oppoversvømming mot overflata for å spise ved solnedgang, med retur til dypere vannlag nær soloppgang (Lampert, 1989). Predasjonsunnnvikelse med hensyn til visuelle predatorer er den mest utbredte forklaringen på nedvandringen til dypere lag (Bollens og Frost, 1991a; Bollens et al., 1992; Frost, 1988; Gliwicz, 1986; Hays, 1995; Hays et al., 1994). Ute i de frie vannmassene finnes ingen skjulesteder, og i øvre lag er byttedyr åpenlyst eksponert for visuelle predatorer om dagen (Kerfoot, 1985). Store og/ eller pigmenterte individer kan være utsatt for visuelle predatorer selv ved svært lave lysintensiteter (Batty et al., 1990; Checkley, 1982; Hays, 1996, 1994; James og Findlay, 1989; Sandström, 1980; Vuorinen et al., 1983).

Individer som finner føde i øvre del av vannsøyla vil kunne stå overfor en situasjon hvor de må avveie predasjonsrisiko mot fødetilgang. Modellstudier viser at fordelene av vertikalvandring vil avhenge av individets kondisjon (Fiksen og Carlotti, 1998; Sekino og Yamamura, 1999). Individer med små fettreserver er forventet å ha større motivasjon for fødesøk og vandring opp enn fettrike. For zooplankton støttes denne antakelsen av data som viser at copepoder (hoppekreps) med små fettlagre var mer villige til å risikere opphold nær overflata enn individer i samme populasjon med bedre kondisjon (Hays et al., 2001a, 1998). Men det gjenstår fortsatt ubesvarte spørsmål om hva som er drivkreftene bak individuelle variasjoner i vertikale vandringsmønstre.

1.2 Den karnivore copepoden *Pareuchaeta norvegica* (Crustacea)

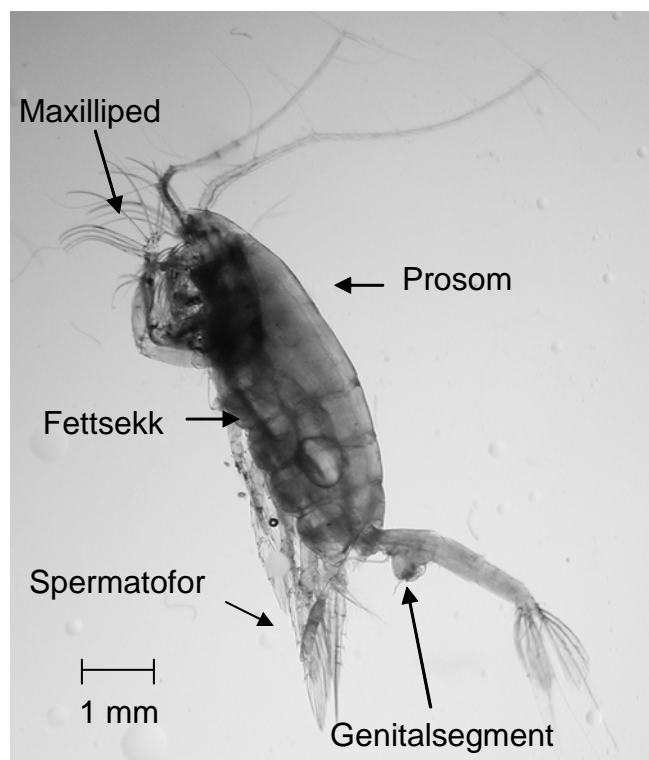
Den calanoide, karnivore copepoden *Pareuchaeta norvegica* (Figur 1) tilhører familien *Euchaetidae* og er som de fleste artene innen slekten *Pareuchaeta* en dyppelagisk art (Park, 1994). *P. norvegica* finnes bare i Nord-Atlanteren, der den er en av de mest vanlige artene av *Euchaetidae* (Park, 1994). *P. norvegica* er vidt utbredt i Norskehavet, den er vanlig langs hele norskekysten og særlig i dype fjorder (Fleddum et al., 2001; Sars, 1903). I Oslofjorden finner man det største antallet utenfor Drøbaksterskelen (Wiborg, 1940).

Pareuchaeta norvegica kan foreta normal DVM med amplitude på flere hundre meter (Bollens og Frost, 1991b; Longhurst og Williams, 1979; Mauchline, 1992; Yen, 1985b), men det finnes også flere studier som viser relativt like dag- og nattfordelinger (Skarra og

Kaartvedt, 2003; Viken, 1995). Tidligere undersøkelser har til dels vist en togruppert vertikalfordeling hvorav bare den øvre gruppen av populasjonen vandrer (Eiane et al., 2002; Kaartvedt et al., 2002; Mauchline, 1992; Yen, 1985a).

Siden *Pareuchaeta norvegica* er en stor copepode, gjennomsnittlig prosomlengde for voksne hunner er i underkant av 6 mm (Ottesen, 1995; Sars, 1903; Yen, 1987), er den i enda større grad enn mindre arter av krepssdyr utsatt overfor visuelle predatorer (Brooks og Dodson, 1965; O'Brien, 1987). Den er dessuten betydelig pigmentert, noe som ytterligere bidrar til synligheten (O'Brien, 1987; Sars, 1903; Zaret og Kerfoot, 1975). Kjønnsmodne hunner får i tillegg sterk blå farge på ovariet. Denne blåfargen beholdes av eggene når disse overføres til modning i oviducten for så etter befruktning ansamles i eggpakke som festes til genitalsegmentet. Dette gjør hunner med modnende egg i oviducten og hunner med eggpakke ekstra synlige (Bollens og Frost, 1991b; O'Brien, 1987). *P. norvegica* har to reproduksjonstopper, en om vinteren og en om sommeren/høsten (Bakke, 1977; Båmstedt, 1975; Hopkins, 1982; Mauchline, 1994; Wiborg, 1954), men det er dokumentert reproduksjon gjennom hele året i norske fjorder (Wiborg, 1940).

Figur 1. Fotografi av umoden, voksen hunn av *Pareuchaeta norvegica*. Foto: Hege Vestheim.



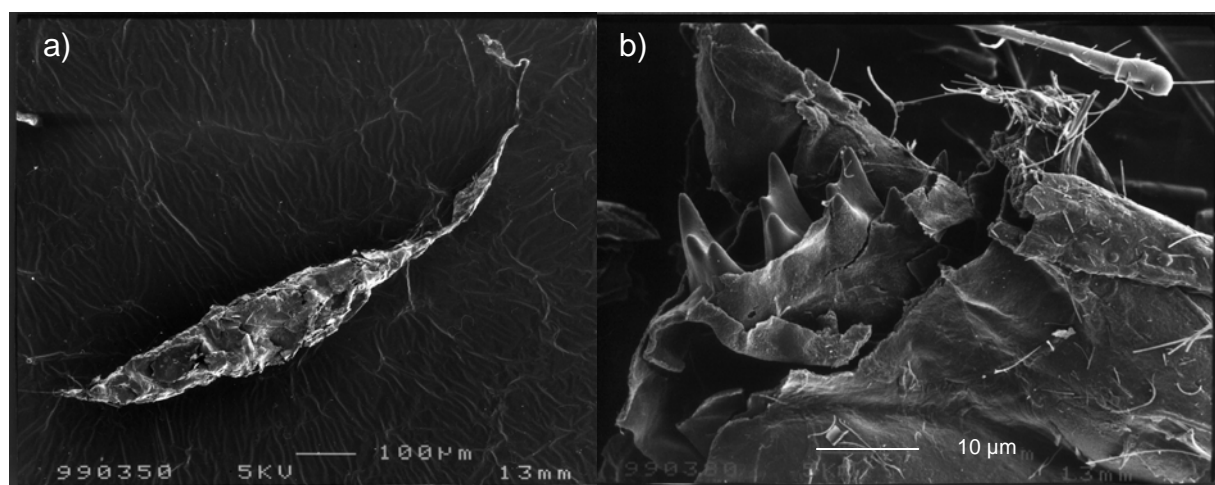
I likhet med andre calanoide copepoder har *P. norvegica* evne til å lagre lipider i en fettsekk. Kvantiteten av lipidinnholdet i fettsekken hos en nær slektning, *P. marina*, er vist å være

korrelert med hunnens reproduktive status, hunner med gjennomsiktige oocytter hadde full sekk, mens hunner med blått ovarium hadde nesten eller helt tom fettsekk (Blades-Eckelbarger, 1991). Hvor lipidrik copepoden er, er også sesongavhengig. Om sommeren kan hele 40% av tørrvekten være lipider, mens lipidkonsentrasjonen om våren er lavere (Båmstedt, 1975; Sargent et al., 1974). Lipidreservene gjør at *Pareuchaeta* kan overleve uten mat i flere måneder (Båmstedt og Holt, 1978). Det vil i denne oppgaven undersøkes om størrelsen på fettlagrene virker inn på individenes vertikale plassering.

1.3 Undersøkelse av fødesammensetning hos zooplankton

1.3.1 Tradisjonelle metoder

Pareuchaeta norvegica antas å spille en viktig rolle i det marine næringsnett (Bakke, 1977; Båmstedt og Skjoldal, 1976; Dale et al., 1999; Mauchline, 1995; Park, 1994). Den er en taktil predator som responderer på bevegelig bytte (Yen, 1987) og det er foretatt en rekke eksperimentelle studier på fødepreferanser hos *Pareuchaeta* (Bailey og Yen, 1983; Olsen et al., 2000; Yen, 1983; Yen, 1987). I feltstudier er den kvalitative fødesammensetningen undersøkt ved lysmikroskopisk analyse av mageinnholdet (Kaartvedt et al., 2002; Ottesen, 1995; Øresland og Ward, 1993) og ved undersøkelse av fekalpelleter ved bruk av elektronmikroskopi (Fleddum et al., 2001) (se Figur 2). Begge disse metodene er tidkrevende, de har forholdsvis lav presisjon da byttedyrrestene i mage og pellet ofte mangler morfologiske, artsspesifikke kjennetegn, og de egner seg ikke i tilfeller der byttet mangler hardere deler.



Figur 2. SEM- (Scanning Electron Microscope) bilde av fekalpellet fra voksne *Pareuchaeta*. a) Hel pellet. b) Del av innholdet i en knust pellet. Skala i μm er markert på bildene. Foto: Anne Lise Fleddum.

1.3.2 DNA-analyse av fekalpelleter – artsspesifikk PCR

Molekylærbiologiske metoder åpner nye muligheter for studier av næringsnett. Som et ledd i denne oppgaven har det vært ønsket å utprøve i hvilken grad det vil være mulig å benytte artsspesifikk PCR (Polymerase Chain Reaction) til analyse av fekalpelleter for å undersøke fødesammensetningen hos karnivore copepoder. PCR-teknikken oppformerer en bestemt del av et genom *in vitro*. Standard PCR har to oligonukleotide primere som veileder polymeraseenzymet fra hver sin ende (PCR, se Palumbi (1996)). I en artsspesifikk PCR (f.eks. Hare et al., 2000), er en eller begge av primerne komplementære til et område av DNAet som er unikt hos målorganismen. For zooplankton har artsspesifikk PCR blant annet vært brukt til å identifisere bløtdyr larver (Hare et al., 2000) og til å skille morfologisk like søsterarter av calanoide copepoder (Bucklin et al., 1999; Hill et al., 2001). Fekalpelleter fra herbivore copepoder har blitt analysert ved bruk av PCR for å finne ut hvilken art som hadde produsert dem (Suzuki et al., 2000), men molekylærbiologiske metoder har ikke tidligere blitt benyttet til å undersøke fødesammensetningen hos karnivore copepoder. Ved bruk av primere som kun binder seg til bytte-DNA, vil man teoretisk kunne undersøke fekalpelleter hos disse med hensyn på bytte.

Utviklingen av artsspesifikke primere for copepoder vil være nyttig ikke bare med tanke på analyse av fekalpelleter, men også for artsbestemming. Mange copepoder har nauplie- og copepodittstadier som vanskelig eller overhodet ikke kan bestemmes morfologisk til art (Dussart og Defaye, 1995). Flere genetisk forskjellige arter er også vanskelige å skille ved hjelp av morfologiske trekk som voksne (Bucklin et al., 1998, 1995; Flemming og Hulsemann, 1977; Jaschnov, 1972).

1.4 Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven er å beskrive og forklare vertikalfordeling hos *Pareuchaeta norvegica* i lys av fysiologisk status. Utgangshypotesen er at individer med mindre fettreserver har større motivasjon for fødesøk og derfor befinner seg grunnere i vannmassene. Det vil videre utprøves i hvilken grad artsspesifikk PCR kan brukes til å bestemme fødesammensetning basert på analyse av fekalpelleter.

2 Materiale og metode

2.1 Lokalitet og innsamlingsperiode

Oslofjorden kan grovt deles inn i Indre og Ytre Oslofjord adskilt av Drøbaksterskelen med et terskeldyp på 19,5 m. De hydrografiske forholdene i Ytre Oslofjord er relativt stabile under overflatelaget (0 - ~20 m) året rundt med temperatur på 6-7 °C og salinitet på ~33 (Andersen et al., 1970; Braarud og Ruud, 1937; Gade, 1968). Prøvene ble samlet inn i løpet av to døgntokt i Ytre Oslofjord med F/F ”Trygve Braarud” 9 -10 april og 13 -14 november 2002. I tillegg ble dyr til fotografering samlet inn på et dagstokt med F/F ”Bjørn Føyn” 24. april 2003. Lokalitet for prøvetakingen var stasjon Elle, 59°37'8" N, 10°37'9" Ø. Elle ligger i Drøbaksundet rett utenfor Drøbaksterskelen. Stasjonen er karakterisert med et dyp på 200 m og det er sterke strømmer i området, særlig knyttet til tidevannstransport (Gade, 1968).

2.2 Miljøparametrer

Temperatur og salinitet ble målt med en Neil Brown Mark IIIB Conductivity-Temperature-Density-sonde (CTD-sonde). CTD-profiler ble tatt i forkant av hvert innsamlingsdøgn. Tid for soloppgang og solnedgang ble hentet fra Det norske meteorologiske institutt og er vist i Tabell 1.

Tabell 1. Tid for soloppgang og solnedgang toktdatoene.

	Vår		Høst		Vår (fotografering)	
	Dato:	Klokkeslett:	Dato:	Klokkeslett:	Dato:	Klokkeslett:
Sol opp:	9. april 02	06.19	13. nov 02	08.09	24. april 03	05.36
Sol ned:	9. april 02	20.20	13. nov 02	15.53	24. april 03	20.56
Sol opp:	10. april 02	06.16	14. nov 02	08.11		
Sol ned:	10. april 02	20.22	14. nov 02	15.51		
Merknad:			Skyet og litt snø 14.11. Noe vind som avtok etter hvert.		Lettskyet og tidvis litt hagl.	

2.3 Byttedyr

For å få en oversikt over byttedyrfordelingen ble det tatt WP-2-planktonnettrekk vertikalt i fire dybdeintervaller som til sammen dekket hele vannsøyla (200-150 m, 150-100 m, 100-50 m og 50-0 m). Trekkhastigheten var 0,7 m/s. Nettet ble lukket i ønsket dyp ved hjelp av Nansenlukker og slipplodd. Det ble benyttet nett med en åpningsradius (r) på 0,285 m og 200

μm maskevidde. Filtrert volum ble beregnet som åpningsareal på håven (πr^2) multiplisert med høyden på den filtrerte vannsøyla. Prøvene ble fiksert med 4% nøytralisert formalin (endelig konsentrasjon). Det ble både vår og høst tatt to dagserier og to nattserier, men bare én dagserie og én nattserie vår og høst ble videre undersøkt. I laboratoriet ble prøvene splittet med en modifisert Folsomsplitter (etter Motoda (1959)). Avhengig av hvor tette prøvene var, ble de splittet 1-3 ganger slik at totalt $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{8}$ av prøven ble undersøkt. Undersøkelsen besto i bestemming av krepsdyr til orden/familie/slekt og eventuelt art der dette lot seg gjøre, samt telling av disse. Sars (1903) og Enckell (1980) ble brukt som bestemmelseslitteratur. Det ble benyttet Leica Wild M10 stereolupe (10 – 80 x forstørrelse). 10 tilfeldig valgte CV eller voksne hunner av *Calanus* fra prøvene både vår og høst ble undersøkt og klassifisert til art. *Calanus finmarchicus* og *C. helgolandicus* ble skilt med hensyn på utformingen av 5. beinpar (Flemming og Hulsemann, 1977; Jaschnov, 1972; Sars, 1903). Beinparet ble dissekert av individene før mikroskopering under Leitz Biomed lysmikroskop (10 - 40 x forstørrelse).

2.4 *Pareuchaeta norvegica*

2.4.1 Innsamling og inkubering

Pareuchaeta norvegica ble samlet med bøylehåv (en modifisert Nansen-håv) med åpningsradius (r) 0,515 m og maskevidde 500 μm . Håven er relativt kraftig og har grovere masker foran enn bak (Reppe, 1986). Det ble benyttet tett samlekkopp for å gjøre innsamlingen mest mulig skånsom. Håven ble trukket vertikalt i 4 dybdeintervaller tilsvarende byttedyrinnsamlingene og filtrert volum ble beregnet som åpningsareal på håven (πr^2) multiplisert med høyden på den filtrerte vannsøyla. Antall individer per m^3 ble beregnet som antall individer i prøven dividert på filtrert volum.

Det ble i dette studiet først og fremst fokusert på voksne hunner av *P. norvegica*. Munndelene hos hannen er degenererte (Sars, 1903) og hannen tar ikke til seg føde i det voksne stadiet (Lowndes, 1935). De voksne hunnene ble inndelt etter modenhetsgrad: Hunner uten synlige egg til modning i oviducten eller eggpakke kalles heretter ”umodne hunner”. Hunner med synlige, blå egg under utvikling i oviducten betegnes ”modnende” (ripening) og hunner med eggpakke festet til genitalsegmentet betegnes som ”hunner med eggpakke” (ovigerous) (Bollens og Frost, 1991b). Om høsten ble i tillegg vertikalfordelingen til juvenile beregnet da disse viste seg å forekomme i relativt stort antall.

P. norvegica ble umiddelbart etter innsamling forsiktig overført til en bakke med sjøvann hentet fra 100 m dyp med Niskin vannhentere. Sjøvannet var filtrert med sug på Whatman® glass mikrofiber-filter (GF/F) som fanger opp partikler ned til 0,7 µm størrelse. Dyrene ble håndtert med pipette med ballong eller en bladpinsett som kun berørte halen eller antennene. Fra den første bakken ble dyrene overført til ny bakke med filtrert sjøvann og det ble kontrollert at det ikke fulgte med potensielle byttedyr. *P. norvegica* ble deretter inkubert i 50 ml sentrifugerør i mørke ved 6 °C i 2 døgn, dette skulle være tilstrekkelig til at tarmen var tømt for peller (Skarra, 1999). 1-6 dyr ble inkubert sammen i hvert rør. Da *P. norvegica* er en ren karnivor art som kun spiser bevegelig bytte (Olsen et al., 2000; Yen, 1987), var det ikke nødvendig med netting eller lignende i bunnen av rørene for å hindre at pelletene ble konsumert under inkuberingen.

Etter endt inkubering ble innholdet i inkuberingsrørene filtrert med sug på Whatman® glass mikrofiber-filter (GF/F), for å få tak i produserte peller. Filtrene ble oppbevart enkeltvis i petriskåler ved –80 °C før telling av antall peller under Leica Wild M10 stereolupe og påfølgende DNA-analyse.

2.4.2 Lengde- og vektmålinger

Lengden av prosomet til de inkuberte dyrene ble målt ved hjelp av en Leica Wild M10 stereolupe med kalibrert målestykke med $\pm 0,04$ mm presisjon. Total kroppslengde kan fås ved å dividere lengden av prosomet med 0,67 (Wiborg, 1940). Lengde og bredde (tykkelse) til fettsekken ble målt der dette lot seg gjøre. *P. norvegica* kan ha sterk pigmentering, særlig foran (Sars, 1903) (se Figur 9), og dette kan tidvis gjøre det vanskelig å se fettsekken. Denne sprekker også lett etter at dyret er dødt. Alle fettsekkene som ble målt ble antatt å ha form som en sylinder da volumet skulle beregnes (Miller et al., 1998).

Etter måling ble dyrene tørket i varmeskap ved 60 °C i 24 timer og tørrvekt ble bestemt på en Mettler toledo-vekt med $\pm 0,0005$ mg presisjon. Eventuell eggpakke ble ikke tatt med. En standard indeks for fysiologisk status er forholdet mellom masse og total lengde. For *P. norvegica* er det vist å være en sammenheng mellom tørrvekt og lipidinnhold, tunge individer har større prosentandel lipider enn lette individer (Båmstedt, 1975).

Alle målingene ble foretatt direkte etter endt inkubering eller etter at dyrene ved inkuberingens slutt umiddelbart var frosset ved –80 °C enkeltvis i 50 µl eppendorfrør fylt med

filtrert sjøvann. De fryste dyrene ble sakte tint før måling, og behandlet slik ble dyret, inkludert fettsekken, bevart intakt.

Det ble i tillegg utført analyse av karbon- og nitrogeninnhold (CN-analyse) av enkelte dyr, men problemer med den nyinnkjøpte analysatoren i innkjøringsfasen gjør at resultatene ikke er videre benyttet.

2.4.3 Kartlegging av pigmentering

Ved feltundersøkelsene ble det observert at dyrene høyt oppe i vannsøyla var langt mindre pigmentert enn dyrene som ble fanget i dypere lag. For å dokumentere dette ble det gjennomført et ekstra tokt hvor *P. norvegica* fra ulike dyp ble fotografert om bord på båten umiddelbart etter innsamling. De samme dyrene ble deretter fotografert på nytt etter ett døgns inkubering i mørke. Det ble benyttet et Nikon coolpix 990 digitalt kamera (3,34 megapixels) med makrofunksjon. Dyrene ble fotografert i en ufarget, klar glasskål med litt filtrert sjøvann plassert på et hvitt underlag. Kameraet ble holdt i 4 cm avstand fra dyrene og det ble ikke benyttet blitz eller annet kunstig lys.

2.4.4 Statistikk

Statistiske analyser ble utført i programpakken S-plus ® 6.1 for Windows. (<http://www.insightful.com/>) (Venables og Ripley, 2002). Konfidensintervaller for gjennomsnittsverdier beregnes i denne programpakken for tilnærmet normalfordelte data ved hjelp av T-fordelingen.

For å kunne sammenligne vertikalfordelingen mellom de ulike trekkene og mellom de ulike gruppene av *P. norvegica*, ble gjennomsnittsdypet, veiet middeldyp (weighted mean depth; WMD), beregnet etter Roe et al. (1984):

$$WMD = \sum (n_{ij} \cdot z_j) / \sum n_{ij}$$

hvor n_{ij} er tettheten av dyr ($n \cdot m^{-3}$) i trekket i , dybdeintervall j . Z_j er middelveiden til dybdeintervallet j .

Andre statistiske tester benyttet, framkommer av resultatdelen.

2.5 DNA-analyse

2.5.1 Økologiske aspekter

Copepoder er en av de viktigste byttedyrgruppene for *Pareuchaeta* (Harding, 1974; Lowndes, 1935; Ottesen, 1995; Shuert og Hopkins, 1987; Yen et al., 1991; Øresland, 1991; Øresland og Ward, 1993), og en viktig slekt er antatt å være *Calanus* (Bagøien et al., 2001; Bathmann et al., 1990). Samtidig er *Calanus* spp. den viktigste føden til fiskelarver slik at tettheten av *Calanus* kan påvirke pelagiske fiskepopulasjoner direkte (Cushing, 1975). Samspillet mellom disse artene er derfor økologisk interessant. Zooplanktonprøvene undersøkt i dette studiet viste seg å inneholde mange individer av *Calanus helgolandicus*, mens bare ett individ av *C. finmarchicus* ble funnet. *C. helgolandicus* er også tidligere vist å være den vanligste arten av *Calanus* i Oslofjorden (Bagøien et al., 2000). Det ble bestemt å undersøke i hvilken grad artsspesifikk PCR-analyse av fekalpelleter kunne brukes til å avdekke hvorvidt *P. norvegica* i Oslofjorden spiste *C. helgolandicus*. Det var derfor nødvendig med en spesifikk primer for PCR som gjorde det mulig å detektere *C. helgolandicus*-DNA i fekalpelleter hos *P. norvegica*.

En *C. helgolandicus*-spesifikk primer utviklet av Bucklin et al. (1999) fantes allerede:

COI-1578: 5' CAT CTC CAA TAA AAG ACC CA 3' T_m = 56 °C

Det ble testet om denne primeren ville være artsspesifikk sammen med DNA ikke bare fra andre *Calanus*-arter, men også med DNA fra calanoide copepoder fra andre slekter inkludert DNA fra produsenten av pelleten, *P. norvegica*. Både programmet beskrevet av Bucklin et al. (1999) og et modifisert program ble prøvd.

Reaksjonen ble ved modifiserte betingelser kjørt ved følgende program:

94 °C 15 min, 94 °C 45 s + 55 °C 45 s + 72 °C 1 min i 35 sykler, 72 °C 10 min.

Programmet var noe forkortet (denaturerings-, annealings- og elongeringstid var redusert fra henholdsvis 1 min, 2 min og 3 min til 45 s, 45 s og 1 min), og annealingtemperaturen var 3 °C over det Bucklin et al. (1999) anbefalte. Dette ble gjort da kortere denatureringstid gir bedre balanse mellom denaturering og ødeleggelse av enzymet, kortere annealingstid er vist å gi økt spesifisitet, elongeringstid på 1 min er mer enn tilstrekkelig for PCR-produkter under 1000 bp og høyere annealingstemperatur er også kjent for å gi økt grad av spesifisitet (Palumbi, 1996).

Reaksjonsmiks benyttet var den samme som for universelle primere (se Tabell 2) med unntak av at primeren HCO-2198 var byttet ut med COI-1578.

Da COI-1578-primeren viste seg å ikke være spesifikk verken ved opprinnelige eller modifiserte forhold, i tillegg til at en annen tilgjengelig *C. helgolandicus*-spesifikk primer, COI-1840, utviklet av Hill et al. (2001) var oppgitt å gi PCR-produkt av to ulike lengder (noe som ville komplisere eventuell sekvensering), ble det forsøkt utformet nye gruppe- eller artsselektive primere for *Calanus*. Primere for andre potensielt interessante byttedyr for *P. norvegica* var ikke tilgjengelig da dette studiet ble utført.

2.5.2 Mitokondrielt cytochrome c oxidase subunit 1-DNA (mtCOI)

Selv for arter som ikke har utviklet morfologiske særtrekk, finner man ofte et mønster av inter- og intraspesifikk variabilitet i mitokondrielt DNA. Dette gjør mtDNA til en nyttig, systematisk, molekylær karakter (Avice, 1994). Calanoide copepoder er vist å ha betydelig variasjon i sekvensen av mtDNA. Tidligere studier har vist tilnærmet 20% nukleotidforskjell, selv mellom nært beslektete arter (Bucklin et al., 1998; Bucklin et al., 2003; Bucklin et al., 1999). Muligheten for å utvikle art- og gruppeselektive primere for copepoder innenfor mitokondrielt DNA var derfor forventet å være til stede.

Cytochrome c oxidase er et nøkkelenzym i aerob metabolisme. Genet som koder for enzymet er et av de mest konservative proteinkodende genene hos dyr og velegnet til studier over lang evolusjonær historie (Brown, 1985). Samtidig er variasjonen i basen i 3. kodonposisjon, særlig i subunit I (COI), stor, både mellom og innen arter (Bucklin et al., 1999; Burton og Lee, 1994; Folmer et al., 1994; Hare et al., 2000; Hill et al., 2001; Pedersen, 1996). Dette gjør denne DNA-regionen velegnet også til studier på populasjons- og artsnivå. Et datasøk etter allerede sekvenserte gener for calanoide copepoder i databasene GenBank og SwissProt viste at det totalt var flest tilgjengelig COI-sekvenser, selv om det også var en del 16S, 18S og 28S-rDNA-sekvenser tilgjengelig. Det ble av disse grunner valgt å bruke art eller gruppeselektive copepode-primere for mtCOI.

2.5.3 DNA-sekvensbestemming for *Pareuchaeta norvegica* og potensielle byttedyr

Mitokondrielt (mt) cytochrome c oxidase subunit 1-DNA (COI-DNA) fra *P. norvegica* og i tillegg fra potensielle krepsdyrbyttedyr for *P. norvegica* som var til stede i zooplanktonprøvene, ble forsøkt amplifisert (oppformert) med et sett universelle COI-primere utviklet av Folmer et al. (1994):

LCO-1490: 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' T_m = 74 °C og

HCO-2198: 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' T_m = 66 °C

(T_m er den temperaturen der halvparten av de potensielle bindingsstedene for primeren antas å ha en primer bundet til seg (Palumbi, 1996)).

Disse primerne er vist å amplifisere et tilnærmet 710 basepar langt område av genet for en rekke invertebrate organismegrupper.

Zooplanktonet som ble benyttet i PCR-reaksjonene var umiddelbart etter fangst frosset til –80 °C eller overført til et glass med 96% etanol. Zooplanktonprøver bør behandles raskt da mange arter, særlig krepsdyr, har mye DNAase, RNAase og protease-aktivitet (Bucklin et al., 2000a). For de etanolfikserte prøvene ble det innen 24 timer byttet til ny 96% etanol og forholdet mellom materiale og sprit var maksimalt 1:4. Når zooplanktonprøver er behandlet på denne måten, vil DNAet holde seg intakt lenge (Bucklin et al., 2000a). Før PCR ble utført fikk krepsdyrene rehydrere enkeltvis i 0,5 ml eppendorfrør med destillert vann i inntil 24 timer. Copepodene var antatt ferdig rehydrert når de hadde sunket til bunns (Bucklin et al., 1999). Vannet ble så pipettert av og reaksjonsblanding tilsatt. DNA ble isolert med DNeasy Tissue Kit (Qiagen) eller hele/deler av dyret ble most med en pipettespiss i et PCR-rør og brukt direkte som templat i PCR uten foregående DNA-ekstraksjon.

PCR-produktet ble sekvensert av Kenneth Weierud på en MegaBACE 1000, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo. Sekvenseringsreaksjonen ble gjort med DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences).

2.5.4 Utforming av artsspesifikke primere

For å utforme art- eller gruppe-spesifikke primere, ble COI-*Calanus*-sekvenser, tilgjengelig på GenBank molecular database på National Center for Biotechnology for Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, sammenlignet (alignet) med alle andre tilgjengelige COI-sekvenser fra calanoide copepoder og *Oithona* spp. I tillegg ble sekvensene sammenlignet med egne sekvenser av *Calanus helgolandicus*, *Chiridius armatus* og *Pareuchaeta norvegica*. Primerspesifisitet avgjøres først og fremst av de siste 1-4 nukleotidene i 3'enden hos oligonukleotiden, så én enkelt, unik nukleotide hos målorganismen kan være nok for artsspesifikk PCR (Hare et al., 2000). Artsspesifikke primere

for *Calanus helgolandicus* ble forsøkt utformet ved å studere et utvalg av alignmentet (se Vedlegg I) og prøve å finne fram til variable områder. En rekke kriterier i henhold til Hare et al. (2000) og Palumbi (1996) skal ideelt sett være oppfylt hos potensielle primere:

- (1) To av fire nukleotider i 3'enden av primeren skal være unike hos målorganismen.
- (2) Terminal nukleotide i 3'enden hos primeren må korrespondere til første eller annen kodonposisjon (da det er forventet mindre variabilitet innen arten der).
- (3) T_m kan grovt beregnes som $4 \times \text{antall C og G} + 2 \times \text{antall A og T}$. Hvis flere primere skulle brukes i samme reaksjon, er det et mål at de har så lik T_m som mulig.
- (4) Hvis det skal utformes spesifikke primere for flere arter/grupper og disse skal skilles fra hverandre med agarosegel-elektroforese, må lengden av det forventete PCR-produktet være forskjellig for de ulike artene/gruppene.
- (5) Primeren bør være 18-24 basepar lang. Innholdet av C og G bør ikke være under 50%.
- (6) Basen T kan binde seg relativt bra med alle de fire nukleotidene, så primeren bør ikke slutte med T da dette vil økt toleransen for feilbinding (mismatch).
- (7) Primeren må ikke binde seg til et område hvor det også er variasjon innen målorganismen.
- (8) Primeren bør bare binde seg ett sted i det området den generelle primeren har amplifisert slik at man kun får ett produkt.
- (9) Primeren må ikke binde seg til seg selv (self-annealing), så man bør unngå komplementære sekvenser innen primeren (palindrom-primer) og mellom primer-par. Det bør ikke være 3 eller flere G'er eller C'er etter hverandre i 3'enden.

De potensielle primerne ble testet for spesifisitet mot utvalgte sekvenser fra alignmentet på ExPASy Molecular Biology Server: <http://us.expasy.org/> og blasted på GenBank molecular database på National Center for Biotechnology for Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Primerne ble i tillegg testet eksperimentelt om de ga falske positive resultater med COI-fragmenter fra *Metridia longa*, *Chiridius armatus*, *Calanus helgolandicus*, *Temora longicornis* og *Pareuchaeta norvegica* (alle Copepoda, Calanoida), *Oithona sp.* (Copepoda, Cyclopoida) og *Conchoecia elegans* (Ostracoda) som templat-DNA. COI-fragmentene fikk jeg ved å bruke de universelle primerne LCO-1490 og HCO-2198 og halve krepsdyr som templat-DNA.

2.5.5 PCR på PCR-produkt (nested PCR)

PCR kan kjøres i to omganger. Man kan benytte universelle primere som ved lav annealingtemperatur uselektivt oppformerer ”alt” tilstedeværende DNA i prøven i den første reaksjonen. Deretter kan man benytte art/gruppespesifikke primere som ligger innenfor de universelle primerne i den neste reaksjonen og kjøre denne under restriktive forhold. Restriktive forhold vil blant annet si høy annealingtemperatur i forhold til T_m . Man vil da kunne amplifisere DNA kun fra et utvalg av det de universelle primerne har amplifisert (nested PCR). I den første PCR-omgangen har de generelle primerne blitt inkorporert i DNAet, slik at man kan velge å bruke en av de generelle primerne sammen med bare én spesifikk primer og allikevel kjøre PCR under strenge forhold i omgang nummer to (semi-nested PCR).

2.5.6 DNA-undersøkelse av pelleter

Etter utforming av art/gruppespesifikke primere, ble det undersøkt om fekalpelleter fra *Pareuchaeta norvegica* inneholdt nok intakt byttedyr-DNA til at det lot seg amplifisere. Det ble kjørt PCR på én og én pellet enkeltvis. Pelletproduksjonen hos *P. norvegica* er vist å være sterkt korrelert med antall copepoder spist (Olsen et al., 2000; Tiselius og Jonsson, 1997), og én pellet inneholder typisk rester fra én copepode (Tiselius og Jonsson, 1997).

Det ble kjørt nested PCR (som forklart i 2.5.5). I det første trinnet ble DNA fra både målorganismen og andre arter til stede i pelleten amplifisert med de universelle primerne, LCO-1490 og HCO-2198. I det andre trinnet ble 1 µl av PCR-produktet brukt i en ny PCR-reaksjon med en artspesifikk copepode-primer, COI-2026, utformet som en del av denne oppgaven, sammen med den universelle primeren HCO-2198.

2.5.7 Laboratoriemateriell og kjemikalier

Det ble benyttet ThermoLabsystems Finnpiptetter og filterspisser fra ART®Molecular Bioproducts under pipetteringen av reagenser. Oligonukleotide primere ble bestilt fra DNA Technology A/S, Danmark. De ble levert oppløst i 200 µl ddH₂O og fortynnet med ddH₂O til 10 µM. Det ble laget reaksjonsløsning for PCR med endelig volum 50 µl og PCR ble kjørt på en Techne Genius termosykler.

2.5.8 PCR-protokoller

Reaksjonsmiks benyttet for generelle primere er vist i Tabell 2.

Tabell 2. Reaksjonsmiks benyttet for generelle primere.

Reagens	Volum / reaksjon	Endelig konsentrasjon
ddH ₂ O	36,9 µl	-
dNTP (2 mM)	5,0 µl	0,2 mM
10 x PCR buffer	5,0 µl	1x/µl
MgCl ₂ (25 mM)	0 µl	1,5 mM
LCO-1490 (10 µM)	1,0 µl	0,2 µM
HCO-2198 (10 µM)	1,0 µl	0,2 µM
Qiagen HotStar Taq TM DNA Polymerase 250 units	0,1 µl	0,5 units/µl
Templat DNA	1 pellet/ 5 µl DNA/ 1 krepsdyr.	-
Totalt	~50 µl	

For de artsspesifikke primerne viste følgende reaksjonsmiks seg å fungere (Tabell 3):

Tabell 3. Reaksjonsmiks benyttet for artsspesifikke primere.

Reagens	Volum / reaksjon	Endelig konsentrasjon
ddH ₂ O	16,9 µl	-
dNTP (2 mM)	5,0 µl	0,2 mM
10 x PCR buffer	5,0 µl	1x/µl
MgCl ₂ (25 mM)	10 µl	6,5 mM
5 x Q-solution ^(*)	10 µl	0,2 x / µl
COI-2026 (10 µM)	1,0 µl	0,2 µM
HCO-2198 (10 µM)	1,0 µl	0,2 µM
Qiagen HotStar Taq TM DNA Polymerase 250 units	0,1 µl	0,5 units/µl
Templat DNA	1 µl PCR- produkt	-
Totalt	50 µl	

*Q-solution inngår i HotStarTaqTMDNA polymerase kit og er et tilsetningsstoff for PCR som modifiserer smelteegenskapene til DNA.

I hver PCR-reaksjon ble 1 µl PCR-produkt fra *C. helgolandicus* tatt med som positiv kontroll samt 1 µl ddH₂O som negativ kontroll.

PCR-program benyttet

Ved bruk av HotStarTaqTM DNA polymerase er det nødvendig med et innledende trinn på 15 min ved 95 °C for å aktivere enzymet. For de generelle primerne ble dette programmet benyttet: 94 °C 15 min, 94 °C 45 s, 37 °C 45 s, 72 °C 1 min 40 sykler, 72 °C 10 min.

For de artsspesifikke primerne ble det funnet gunstig å bruke følgende touch down PCR-program: 94 °C 15 min, 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 30 s 1 sykel; 94 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 30 s 1 sykel; 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 30 s 1 sykel; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s 35 sykler; 72 °C 10 min.

2.5.9 Kontroll av PCR-produktet

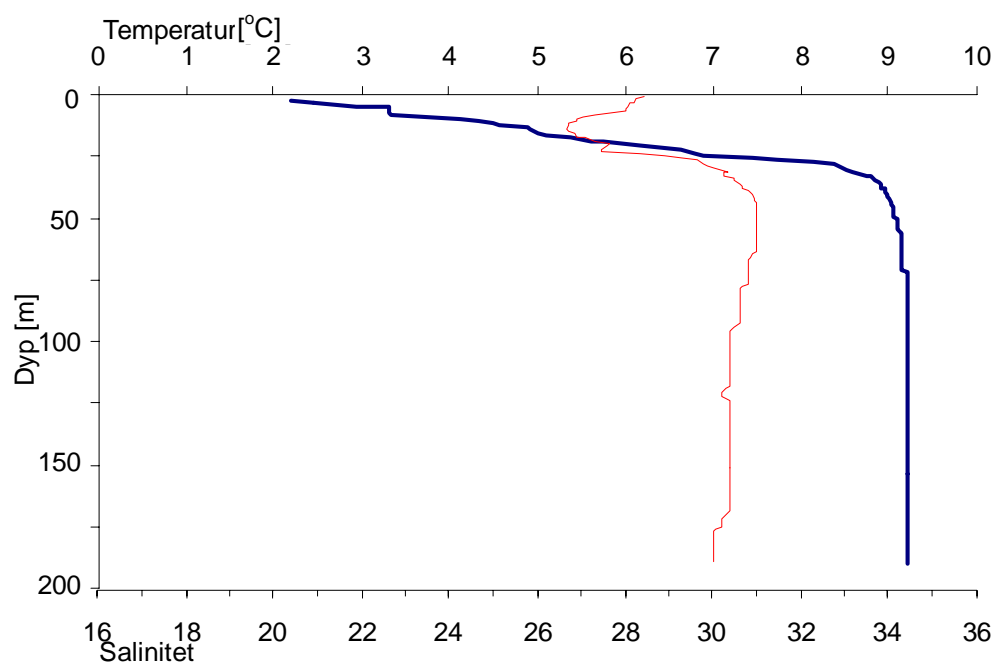
PCR-produktet ble bestemt ved å kjøre amplifiseringsproduktet på en 0,8% agarosegel farget med etidiumbromid (0,5 µg/ml) i 30 min ved 83 V (Consort E32). Gelen ble undersøkt på UV-bord (transilluminator) og fotografert med Gen Cam polaroidkamera (667 polaroid film) (Sambrook og Russel, 2001). I tillegg ble utvalgte PCR-produkter sekvensert direkte som kontroll. Resultatet ble alignet i programpakken BioEdit v. 5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) og ClustalW (<http://www.es.emblnet.org/Services/production.html>). BLAST-analyse ble utført i GenBank molecular database på National Center for Biotechnology for Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3 Resultater

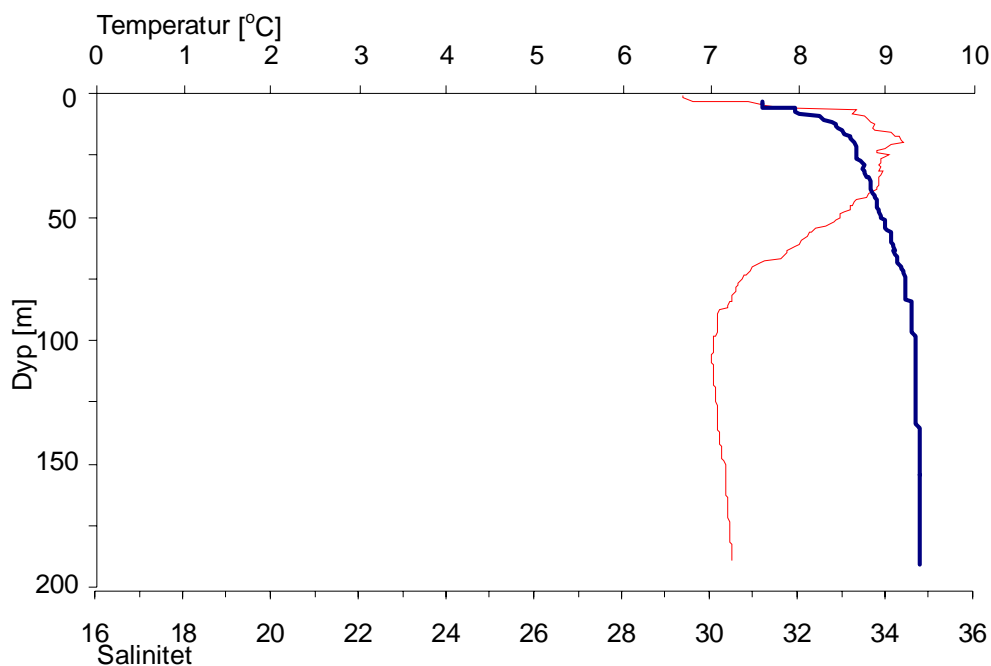
3.1 Miljøparametere - CTD-profiler

Om våren (9. april 2002) sank temperaturen fra 6,2 °C i overflata til 5,3 °C ved 14 meters dyp (Figur 3). Deretter steg temperaturen nedover til den holdt seg stabil på rundt 7,3 °C fra 30 m og nesten helt ned til bunnen (200 m). Fra 170 meter avtok temperaturen igjen noe. Saliniteten steg raskt fra 20,4 i overflata til 34,0 ved 40 m og fra 80 m holdt den seg stabil på 34,4 helt til bunn (Figur 3).

Om høsten (13. november 2002) var temperaturen i overflata 6,6 °C (Figur 4) og nådde sitt maksimum på 9,2 °C ved 18 m. Temperaturen var stabil på ~7,1 °C fra 87 m ned til bunnen. Saliniteten økte fra 31,5 i overflata til 34,6 ved 82 m. Derfra steg saltholdigheten ubetydelig til 34,8 ved 190 m.



Figur 3. Temperatur (tynn grå linje) og salinitet (tykk svart linje) som funksjon av dypet, 9. april 2002 (vår).

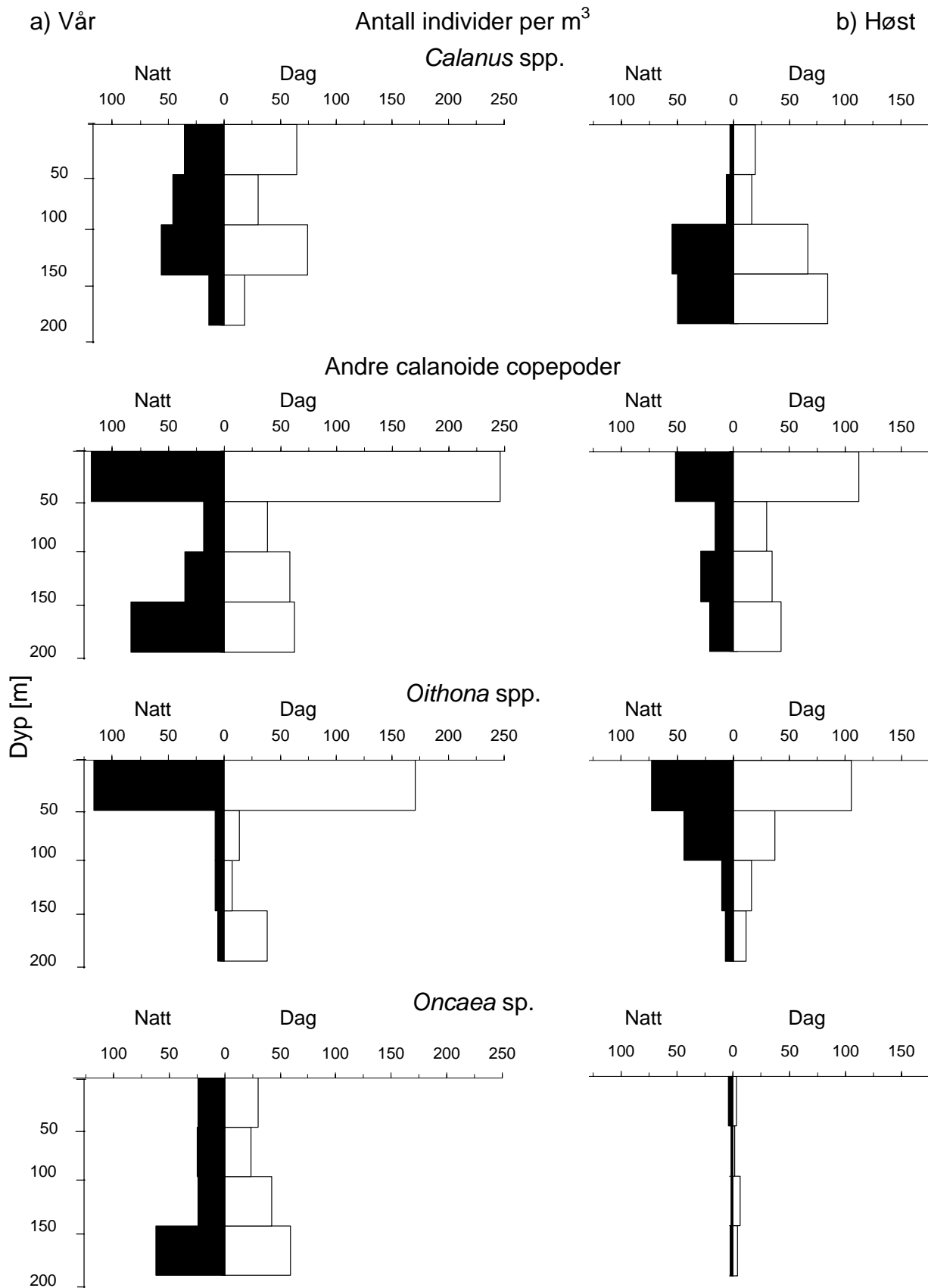


Figur 4. Temperatur (tynn grå linje) og salinitet (tykk svart linje) som funksjon av dypet, 13. november 2002 (høst).

3.2 Byttedyr

Både vår og høst var det størst byttedyrtetthet, og da særlig av små dyr mindre enn 1 mm, i de øverste 50 meterne av vannsøyla, både dag og natt. Om våren var *Calanus* spp. tallrike i hele vannsøyla (20-60 ind·m⁻³) (Figur 5). Nærmere undersøkelse av 10 enkeltindivider viste at det var flest *C. helgolandicus* (én *C. finmarchicus* ble funnet). Det var også et stort innslag av andre calanoide copepoder i vårprøvene; *Acartia* sp. og *Temora* sp. var tallrike, særlig over 50 m (125 ind·m⁻³). *Metridia longa*, *M. lucens*, *Chiridius armatus*, *Paracalanus* sp. og *Microcalanus* sp., juvenile former av *Pareuchaeta norvegica*, samt uidentifiserte nauplier og copepodittstadier var vanlige. Cyclopoide copepoder av familien *Oithona* spp. var svært tallrike, spesielt over 50 m og det var mest av *O. similis* (145 ind·m⁻³) (Figur 5). *Oncaea* sp. (*Poecilostomatoida*) var tallrik i hele vannsøyla (25-60 ind·m⁻³) og det var også et betydelig innslag av ostracoder (10-60 ind·m⁻³).

Om høsten var *Calanus* spp. den vanligste copepoden, men den fantes nå i størst antall under 100 m (75 ind·m⁻³) (Figur 4). Nærmere undersøkelse av 10 enkeltindivider, viste at i likhet med om våren var de fleste *C. helgolandicus* (ingen *C. finmarchicus* ble funnet). Andre calanoide copepoder forekom også; *Metridia longa*, *Chiridius armatus* og juvenile former av



Figur 5. Fordeling av potensielle byttedyr (copepoder) for *Pareuchaeta norvegica*. Søylediagrammene viser antall individer per m³ (x-aksene) som funksjon av dypet (y-aksene) a) vår (venstre rad) og b) høst (høyre rad). Fordelingene er beregnet utfra én dagtelling og én nattelling hver årstid.

Pareuchaeta norvegica var vanlige under 100 m, *Pseudocalanus* spp. og *Microcalanus* sp. hadde en litt grunnere fordeling. *Oithona similis* var den mest tallrike copepoden over 50 m (90 ind m^{-3}), mens *O. atlantica* var vanlig i de dypere intervallene. *Oncaea* sp. var ikke så tallrik om høsten som den var om våren ($2\text{-}4 \text{ ind m}^{-3}$). Det var også nå et innslag av ostracoder i prøvene, særlig under 150 m, hvorav *Conchoecia elegans* var en tallrik art (30 ind m^{-3}).

3.3 Vertikalfordeling *Pareuchaeta norvegica*

Voksne hunner av *Pareuchaeta norvegica* forekom i størst antall under 150 m både vår og høst (Figur 6). Det var ingen markert forskjell i veid middeldyp (WMD) mellom dag og natt, slik at ingen stor grad av synkronisert døgnlig vertikalvandring ble påvist. Umodne hunner hadde en grunnere fordeling enn modnende hunner og hunner med eggpakke, og juvenile befant seg høyere i vannsøyla enn voksne (Figur 7 og 8).

3.3.1 Vertikalfordelingen vår

Om våren befant de fleste individene av *Pareuchaeta norvegica* seg i den nederste delen av vannsøyla; det var flest individer i dybdeintervallet 200-150 m, og suksessivt avtagende antall individer mot overflaten (Figur 6a). Veid middeldyp (WMD) for umodne hunner (i gjennomsnitt 76 m) var signifikant grunnere enn for modnende hunner og hunner med eggpakke (i gjennomsnitt 150 m) ($T_{24} = -16,78$, $p=0,000$) (Figur 7). Det var ingen forskjell i veid middeldyp mellom hunner med eggpakke (i gjennomsnitt 152 m) og modnende hunner (i gjennomsnitt 145 m) ($T_{24} = 0,93$, $p=0,36$) (Figur 7). Veid middeldyp om dagen var ikke signifikant forskjellig fra veid middeldyp om natta, verken for modnende hunner og hunner med eggpakke (i gjennomsnitt henholdsvis 150 og 151) ($T_{11}=-0,186$, $p=0,86$) eller umodne hunner (i gjennomsnitt henholdsvis 73 og 80) ($T_{11}=-0,806$, $p=0,44$). Ingen døgnlig vertikal vandring ble dermed påvist.

Det ble registrert at en rekke hunner hadde en eller flere spermatoforer festet til genitalsegmentet i vårprøvene (se Figur 1).

3.3.2 Vertikalfordelingen høst

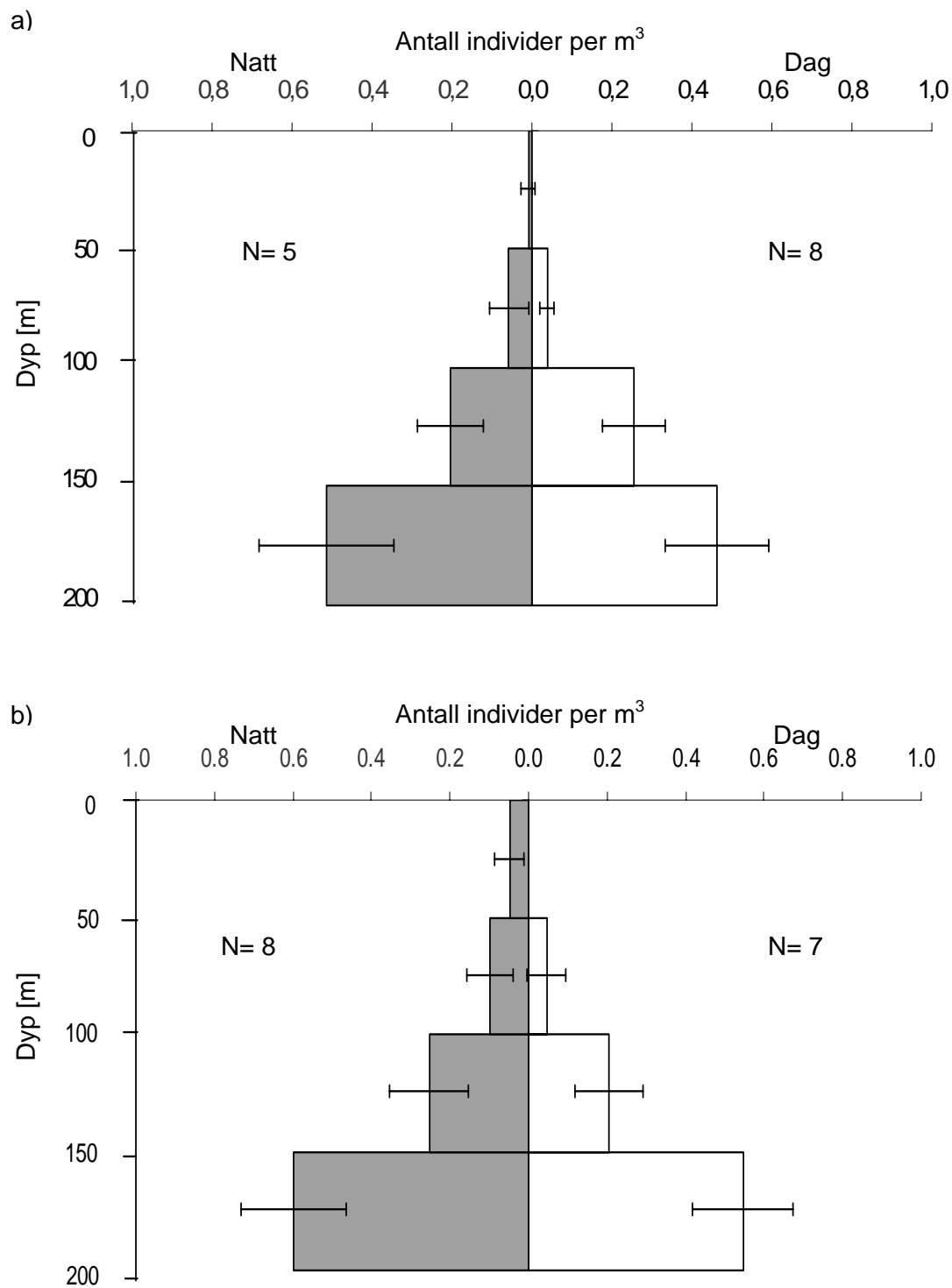
Vertikalfordelingen om høsten var i hovedsak den samme som den som ble funnet om våren (Figur 6b), med størst tetthet av *P. norvegica* fra bunn opp til 150 m og suksessivt avtagende antall individer opp mot overflata (Figur 6b). Lavest tetthet var det fra 50 m og opp til overflata der ingen individer ble fanget om dagen, men noen ble fanget der om natta, i natttrekkene som ble foretatt før midnatt. Veid middeldyp om dagen (i gjennomsnitt 154 m),

var signifikant dypere enn veid middeldyp om natta (i gjennomsnitt 144 m) ($T_{13}=2,22$, $p=0,04$).

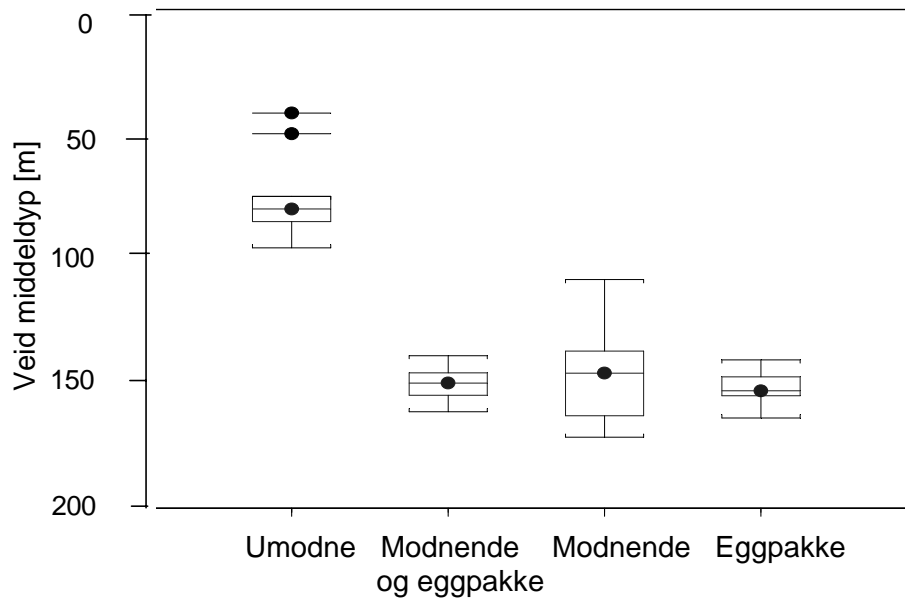
Juvenile sto høyere i vannmassen enn adulte hunner (Figur 6 og 8) (gjennomsnittlig veid middeldyp \pm 95% CI var 125 ± 9 mot 149 ± 5 m).

Svært få modnende hunner eller hunner med eggpakke ble registrert ($n=12$), men mange hunner hadde også denne gangen en eller flere spermatoforer festet til genitalsegmentet.

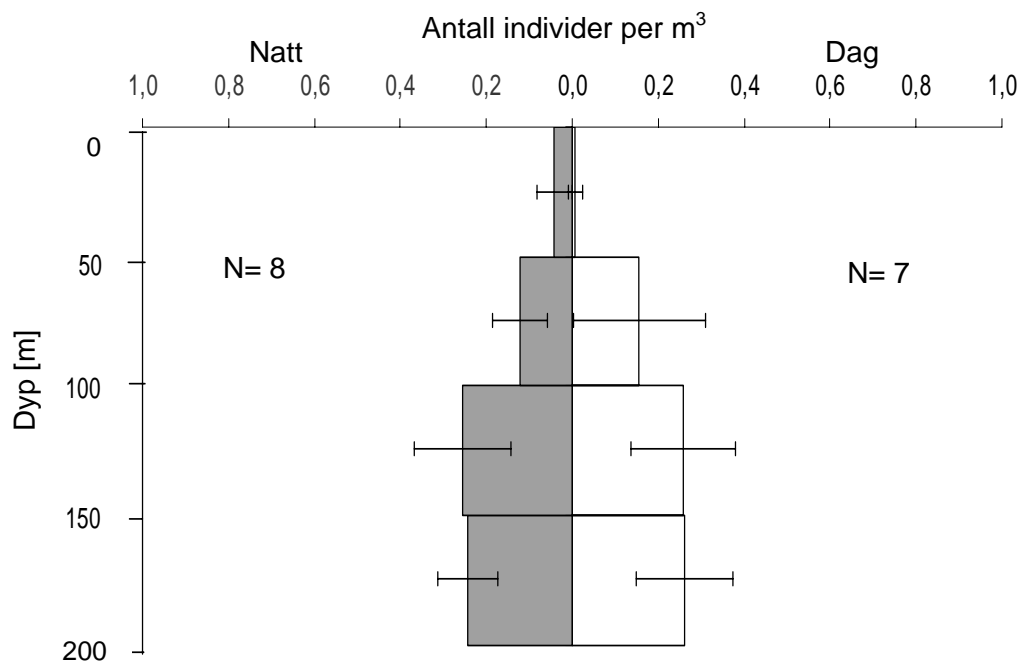
Både om våren og om høsten ble det observert at individene fanget over 100 meter nesten var helt gjennomsiktige og manglet den kraftige, frontale, røde pigmenteringen som karakteriserte individene fanget dypere. Det viste seg imidlertid at *P. norvegica* raskt endret grad av pigmentering i forhold til lysforholdene. Etter inkubering i 24 timer i mørke var det ikke lenger så markant forskjell på dyrene med hensyn på pigmenteringsgrad. Fotografier av dyr fra ulike dyp tatt henholdsvis rett etter innsamling og etter at dyrene var inkubert i mørke i ett døgn er vist i Figur 9.



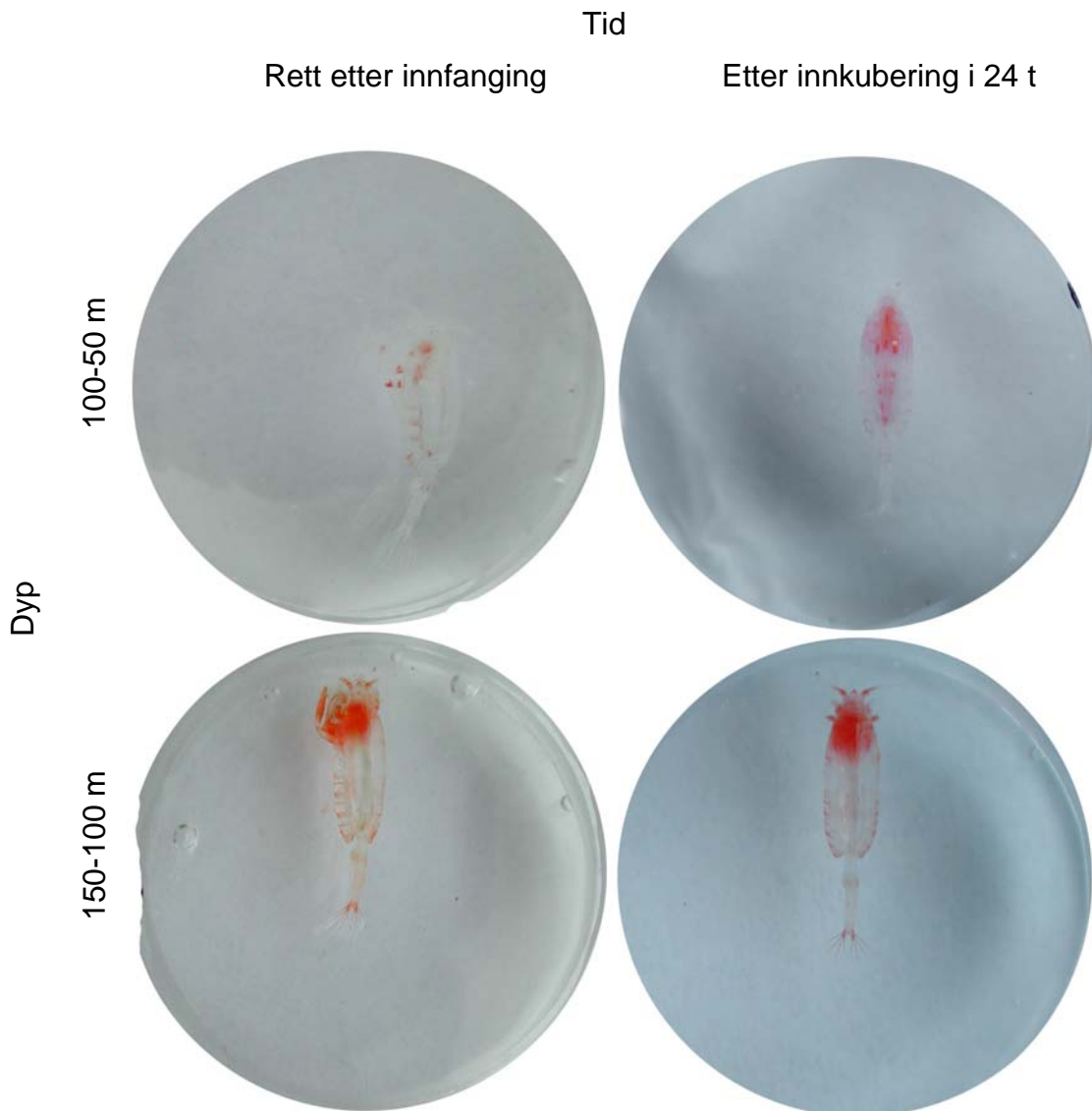
Figur 6. Vertikalfordeling for *Pareuchaeta norvegica*. a) Vertikalfordeling for voksne hunner, vår. b) Vertikalfordeling for voksne hunner, høst. Mørke søyler viser nattverdier, hvite søyler viser dagverdier for gjennomsnittlig antall voksne hunner fanget i de ulike dybdeintervallene med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet.



Figur 7. Veid middeldyp om våren for henholdsvis umodne hunner, modnende hunner og hunner med eggpakke, bare modnende hunner og bare hunner med eggpakke, $n=13$. (Den sentrale vertikale linjen i boksene markerer medianen, den øverste og nederste kanten på boksene representerer henholdsvis 1. og 3. kvartil. "Whiskers" markerer området for verdier som faller innenfor $1,5 \times$ verdien av 3-1 kvartil, horisontale linjer utenfor representerer uteliggere (avvikere) (verdier større enn $1,5 \times$ området for verdien av 3-1 kvartil)).



Figur 8. Vertikalfordeling for juvenile *Pareuchaeta norvegica*, høst. Mørke søyler viser nattverdier, hvite søyler viser dagverdier for gjennomsnittlig antall voksne hunner fanget i dybdeintervallet med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet.



Figur 9. Fotografier av voksne hunner av *Pareuchaeta norvegica* fanget i dybdeintervallet 100-50 m (øverste rad) og 100-150 m (nederste rad) henholdsvis rett etter innfanging (venstre kolonne) og etter inkubering i mørke i ett døgn (høyre kolonne). Det er de to samme individene som er fotografert begge gangene. Dyrene fanget høyt oppe i vannsøylen manglet ofte den kraftige, røde pigmenteringen som karakteriserte særlig den fremre delen av individene som ble fanget dypere. Forskjellen i pigmentering utjevnet seg imidlertid etter inkubering under like lysforhold.

3.4 Kondisjonsparametre

Det var til dels stor individuell variasjon i tørrvekt, kroppslengde og volum av fettsekken både vår og høst også mellom individer fanget i det samme dybdeintervallet. Det var likevel en trend at de voksne individene som befant seg i den øvre delen i vannsøyla hadde kortere prosom, lavere tørrvekt og lavere tørrvekt/lengde-forhold enn dem som oppholdt seg lengre ned (Figur 10 og 11 og Tabell 4 og 5). Om våren gjaldt dette bare for modnende hunner og hunner med eggpakke, men det var da også en forskjell i volumet av fettsekken, med mindre fettsekk for individene som befant seg høyt oppe. Det var bare kroppslengden for hunner med eggpakke som var signifikant forskjellig fra kroppslengden hos umodne hunner, tørrvekt og volumet av fettsekken var ikke korrelert med modenhetsgrad (Tabell 4).

3.4.1 Prosomlengde

Både vår og høst var de voksne individene som befant seg i den øvre delen av vannsøyla litt kortere enn individer av tilsvarende modenhetsgrad som befant seg dypere (Figur 10a og 11a og Tabell 4). Hunner med eggpakke hadde gjennomsnittlig 1,8% lengre prosom enn umodne hunner, mens modnende hunner ikke skilte seg signifikant fra noen av de andre gruppene. Det var om våren ingen signifikant forskjell i prosomlengde med hensyn på dyp når man så på umodne hunner, modnende hunner og hunner med eggpakke hver for seg (Tabell 4).

3.4.2 Tørrvekt

Det var om våren ingen forskjell i gjennomsnittlig tørrvekt med hensyn på dyp for alle hunner sett samlet (Figur 10b). Det var heller ingen forskjell i gjennomsnittlig tørrvekt mellom umodne hunner, modnende hunner og hunner med eggpakke (Tabell 4). Ved å se på umodne hunner, modnende hunner og hunner med eggpakke hver for seg, var de modnende hunnene og hunnene med eggpakke som sto grunnest, lettere enn de som ble fanget dypere (Tabell 4). Modnende hunner fanget fra 100-50 m var 19% lettere enn de som ble fanget dypere, og hunner med eggpakke fanget fra 100-50 m var hele 73% lettere enn de som ble fanget i dybdeintervallet under. Tørrvekt var bare korrelert med prosomlengde med en korrelasjonsfaktor 0,38 ($R^2=0,1506$, standard lineær regresjon, $F_{1,340}=60,3$, $p=0,000$).

Om høsten økte gjennomsnittlig vekt med dypet. Den gjennomsnittlige vekten for hunner fanget i dypet 100-50 m var 24% lavere enn for hunner fanget fra 150-100 m, og deres gjennomsnittsvekt var igjen 19% lavere enn hunner fanget i dypet 150-200 m (Figur 10b og

Tabell 4). Tørrvekt var også nå bare i relativt liten grad korrelert med prosomlengde, denne gang med en faktor på 0,43 ($R^2=0,1855$, standard lineær regresjon, $F_{1,115}=26,19$, $p=0,000$).

3.4.3 Tørrvekt/total lengde-forhold

Om våren økte gjennomsnittlig tørrvekt/total lengde-forhold med økt dyp for hunner med eggpakke og modnende hunner (Tabell 4). Hunner med eggpakke fanget fra 100-50 m hadde gjennomsnittlig 60% lavere tørrvekt/lengde-forhold enn de som ble fanget dypere (Tabell 4). For modnende hunner var forskjellen noe mindre (16%) (Tabell 4). Det var ingen forskjell i tørrvekt/total lengde-forhold med hensyn på dyp for umodne hunner (Tabell 4). Det var heller ingen forskjell i gjennomsnittlig tørrvekt/total lengde-forhold mellom umodne hunner, modnende hunner og hunner med eggpakke (Tabell 4).

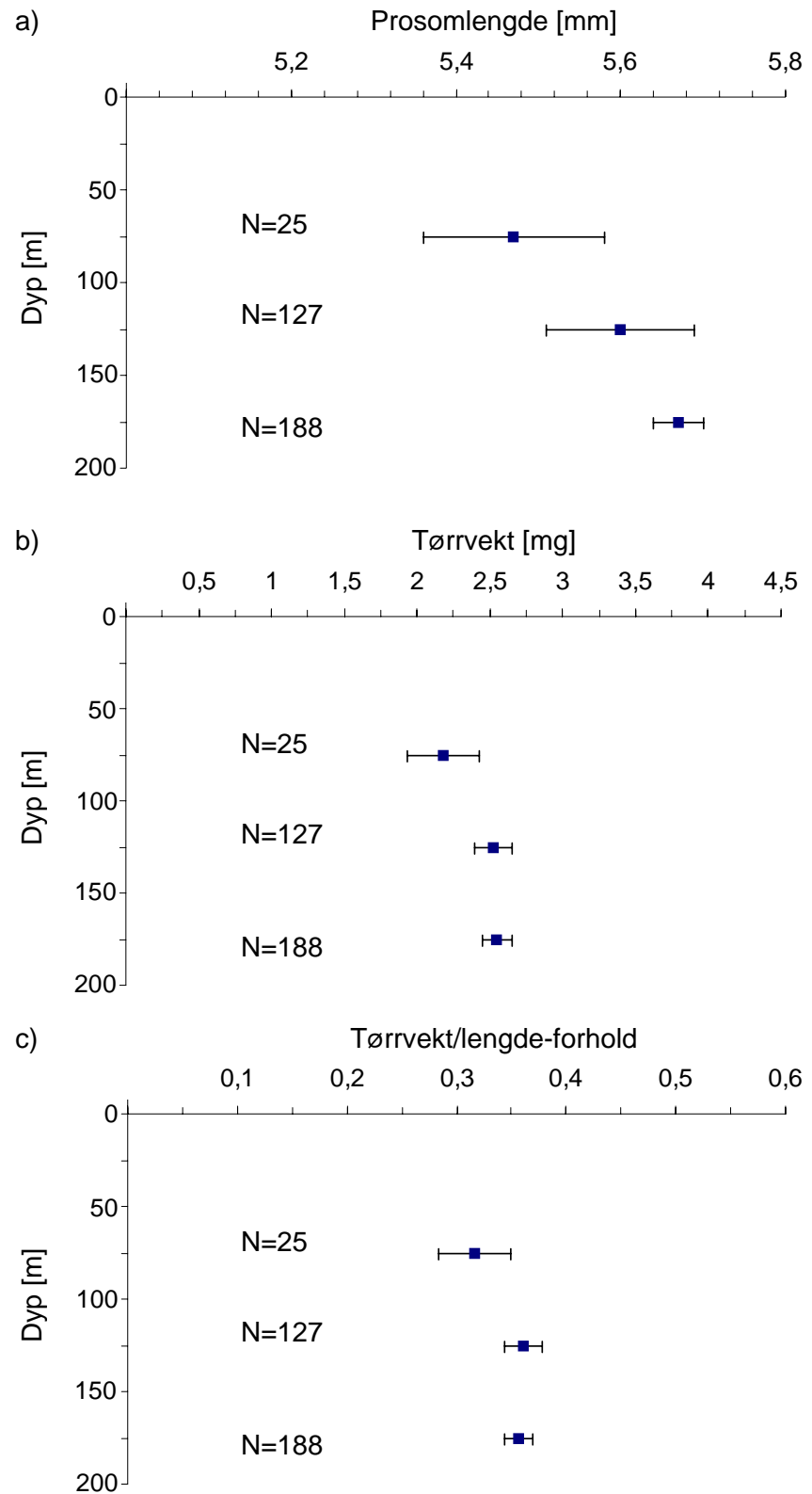
Om høsten økte gjennomsnittlig vekt/lengde-forhold anslagsvis 10-20% nedover i dypet med de ulike dybdeintervallene (Figur 11c og Tabell 4). Hunnene som ble fanget i dybdeintervallet 100-50 m hadde lavere gjennomsnittlig vekt/lengde-forhold enn de som ble fanget fra 100-150 m, som igjen hadde lavere vekt/lengde-forhold enn de som ble fanget fra 200-150 m (Figur 11c og Tabell 4).

3.4.4 Fettsekkmålinger

Om våren økte også størrelsen på fettsekken med økt dyp (Tabell 4 og 5). Individene som ble fanget i intervallet 150-100 m hadde signifikant mindre (26%) fettsekker enn individene dypere ned (200-100 m) (Tabell 4). Ved å se på umodne hunner og hunner med eggpakke hver for seg (modnende hunner med er ikke tatt med da man ikke så lett ser fettsekken hos disse), var det bare en forskjell med hensyn på dyp for hunner med eggpakke. Det var ikke forskjeller i størrelsen av fettsekken mellom umodne hunner og hunner med eggpakke. Hunner med eggpakke hadde ikke signifikant større fettsekk enn umodne hunner (Tabell 4).

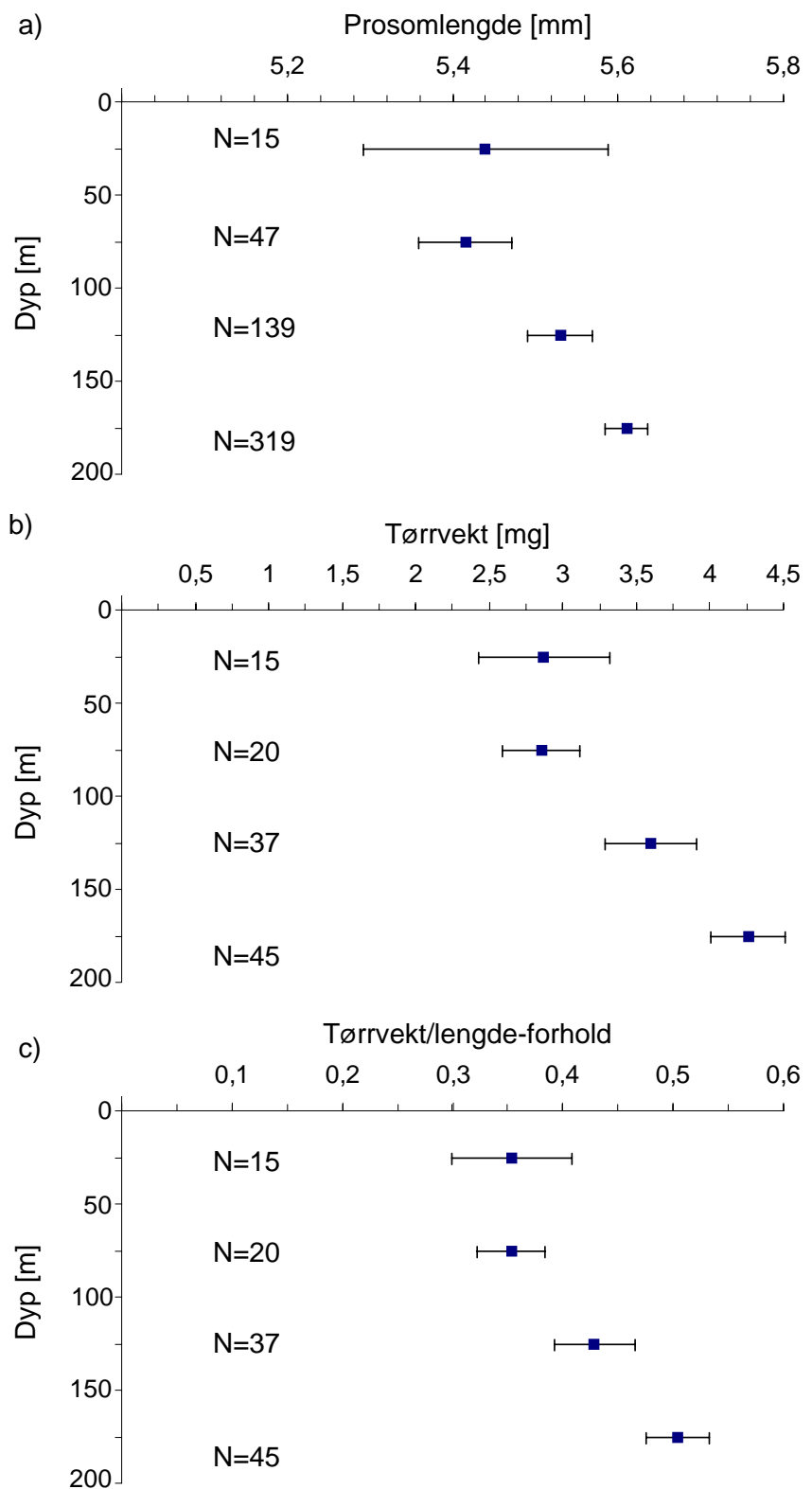
Om høsten var det ingen signifikant forskjell i volum av fettsekken i forhold til dypet individene ble fanget i (Tabell 4).

Vår



Figur 10. Prosomlengde (a), tørrvekt (b) og tørrvekt/total lengde (c) i forhold til dyp for alle voksne hunner av *P. norvegica* fanget om våren. Figuren viser gjennomsnittsverdier med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet.

Høst



Figur 11. Prosomlengde (a), tørrvekt (b) og tørrvekt/total lengde (c) i forhold til dyp for alle voksne hunner av *P. norvegica* fanget om høsten. Figuren viser gjennomsnittsverdier med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet.

Tabell 4. Prosomlengde [mm], tørrvekt [mg], tørrvekt/total lengde-forhold og volum av fettsekken [mm³] hos voksne hunner av *P. norvegica* fanget om våren i forhold til dyp og modenhetsgrad. Tabellen viser gjennomsnittsverdier med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet i parentes. Uthevet skrift for to tall som står under hverandre eller ved siden av hverandre markerer verdier som er signifikant forskjellige.

Vår	Dyp	Modenhetsgrad					
		Hunner med eggpakke		Modnende hunner		Umodne hunner	
		\bar{x} (95% CI)	N	\bar{x} (95% CI)	N	\bar{x} (95% CI)	N
Prosom- lengde [mm]	0-50 m	-		-		-	
	50-100 m	5,39 (4,78, 5,99)	3	5,46 (5,12, 5,79)	5	5,49 (5,34, 5,65)	17
	100-150 m	5,60 (5,53, 5,67)	71	5,58 (5,46, 5,71)	21	5,46 (5,34, 5,57)	35
	150-200 m	5,68 (5,63, 5,72)	120	5,69 (5,61, 5,77)	44	5,59 (5,47, 5,70)	24
	Totalt	5,65 (5,61, 5,68)	194	5,57 (5,58, 5,70)	70	5,50 (5,43, 5,58)	76
Tørrvekt [mg]	0-50 m	-		-		-	
	50-100 m	1,5 (1,2, 1,9)	3	2,1 (2,0, 2,3)	5	2,3 (2,0, 2,7)	17
	100-150 m	2,6 (2,4, 2,8)	71	2,5 (2,4, 2,7)	21	2,4 (2,1, 2,7)	35
	150-200 m	2,5 (2,4, 2,6)	120	2,6 (2,4, 2,8)	44	2,6 (2,1, 3,0)	24
	Totalt	2,5 (2,4, 2,6)	194	2,6 (2,4, 2,7)	70	2,4 (2,2, 2,6)	76
Vekt/ lengde	0-50 m	-		-		-	
	50-100 m	0,23 (0,21, 0,25)	3	0,31 (0,30, 0,33)	5	0,33 (0,29, 0,38)	17
	100-150 m	0,37 (0,34, 0,39)	71	0,36 (0,34, 0,39)	21	0,34 (0,31, 0,39)	35
	150-200 m	0,35 (0,34, 0,37)	120	0,37 (0,34, 0,40)	44	0,35 (0,31, 0,40)	24
	Totalt	0,36 (0,34, 0,37)	194	0,35 (0,35, 0,38)	70	0,34 (0,32, 0,37)	76
Volum fettsekk [mm³]	0-50 m						
	50-100 m	0,28 (0,04, 0,52)	8			0,95 (0,61, 1,29)	13
	100-150 m	1,12 (0,97, 1,28)	66			0,99 (0,71, 1,27)	24
	150-200 m	1,51 (1,34, 1,68)	103			1,22 (0,91, 1,52)	18
	Totalt	1,35 (1,23, 1,47)	177			1,06 (0,89, 1,23)	55

Tabell 5. Volum av fettsekken [mm³] som funksjon av dyp for alle voksne hunner av *P. norvegica* samlet vår og høst. Tabellen viser gjennomsnittsverdier med 95% konfidensintervall for gjennomsnittet i parentes. Uthevet skrift for to tall som står under hverandre eller ved siden av hverandre markerer verdier som er signifikant forskjellige.

Dyp	Volum av fettsekken [mm ³]			
	Vår		Høst	
	\bar{x} (95% CI)	N	\bar{x} (95% CI)	N
0-50 m		-	0,62 (-)	4
50-100 m	0,86 (0,55, 1,18)	21	0,80 (0,54, 1,06)	17
100-150 m	1,09 (0,96, 1,22)	90	0,72 (0,65, 0,80)	30
150-200 m	1,47 (1,32, 1,62)	121	0,60 (0,54, 0,66)	96
Totalt	1,28 (1,18, 1,38)	232	0,65 (0,60, 0,70)	147

3.4.5 Vår vs høst

Det var ingen forskjell i prosomlengden mellom de voksne hunnene fanget om våren i forhold til hunnene fanget om høsten (gjennomsnittlig prosomlengde \pm 95% CI var henholdsvis 5,61 \pm 0,1 mm, n = 340 (vår) og 5,57 \pm 0,05 mm, n = 520 (høst)). Men hunnene fanget om våren var signifikant lettere enn dem som ble fanget om høsten (gjennomsnittlig tørrvekt \pm 95% CI var 2,5 \pm 0,1 mg, n = 340 (vår) og 3,6 \pm 0,15 mg, n = 117 (høst)). Hunnene fanget om våren hadde også 19% lavere tørrvekt/lengde-forhold enn dem som ble fanget om høsten (gjennomsnittlig tørrvekt/total lengde-forhold \pm 95% CI var henholdsvis 0,36 \pm 0,01, n = 340 (vår) og 0,43 \pm 0,02, n = 117 (høst)). Fettsekken derimot var derimot større hos individene fanget om våren i forhold til dem som ble fanget om høsten (Tabell 5).

3.5 Pelletproduksjon

Pelletproduksjonen var gjennomgående liten (0-6 pilleter ble produsert per individ i løpet av to døgns inkubering), og de fleste individene produserte ikke pilleter, verken om våren eller om høsten. Antall pilleter som funksjon av tid og dyp er vist i Tabell 6.

Om våren produserte individene fanget om natta (gjennomsnitt 0,23) halvparten så mange pilleter i løpet av to døgns inkubering som individene fanget om dagen (gjennomsnitt 0,44) og forskjellen var signifikant (Wilcoxon rank-sum test, $Z=2,014$, $p=0,044$). Det var ingen

forskjell i produserte pelleter med hensyn på dyp (Kruskal-Wallis rank sum test, $df=3$, $\chi^2=3,3617$, $p=0,339$) (Tabell 6). Det maksimale antallet produserte pelleter var 3,2 per copepode og forekom i det dypeste dybdeintervallet (150-200 m).

Om høsten var det ingen forskjell i antall produserte pelleter mellom individer fanget henholdsvis om dagen og natta (Wilcoxon rank-sum test, $Z=-1,466$, $p=0,14$). Det var derimot nå en betydelig forskjell med hensyn på dyp. Dyrene fanget over 50 meter (gjennomsnitt 1,25) produserte flere pelleter enn dyrene fanget under 150 m (gjennomsnitt 0,16) (Wilcoxon rank-sum test, $Z=2,73$, $p=0,006$, $n=16$). Dyrene fanget i intervallet 50-100 m (gjennomsnitt 0,68) produserte også flere pelleter i forhold til de fanget under 150 m (Wilcoxon rank-sum test, $Z=2,15$, $p=0,04$, $n=34$), men det var ingen signifikant forskjell i antall produserte pelleter mellom individene fanget fra 150-100 m og de fanget under 150 m (Wilcoxon rank-sum test, $Z=1,06$, $p=0,29$, $n=47$).

Individene produserte litt flere pelleter om høsten (gjennomsnitt 0,44) enn om våren (gjennomsnitt 0,36) og denne forskjellen var signifikant (Wilcoxon rank-sum test, $Z=-3,054$, $p=0,002$, $n=80$).

Tabell 6. Gjennomsnittlig antall pelleter produsert i løpet av to døgns inkubering med hensyn til dyp og tid (natt og dag), vår og høst. Uthevet skrift for to tall som står under hverandre eller ved siden av hverandre markerer verdier som er signifikant forskjellige.

Dyp/Tid	Vår		Høst	
	Gjennomsnittlig antall pelleter per individ	N	Gjennomsnittlig antall pelleter per individ	N
0-50 m	-		1,25	16
50-100 m	0,42	11	0,68	34
100-150 m	0,34	28	0,46	51
150-200 m	0,36	38	0,16	83
Natt	0,23	32	0,53	110
Dag	0,44	47	0,31	74
Totalt	0,36	79	0,44	184

3.6 Molekylær analyse

3.6.1 Sekvenssammenligninger

De universelle primerne LCO-1490 og HCO-2198 amplifiserte et ~700 basepar langt område av mtCOI-DNA for *Pareuchaeta norvegica*, *Chiridius armatus*, *Calanus helgolandicus*, *Metridia longa* og *Temora longicornis*. Forsøk på amplifisering av DNA fra *Oncaea borealis*, *Oithona similis*, *O. atlantica* og *Conchoecia elegans* ga ikke synlige bånd på agarosegel med protokollen beskrevet i 2.5.8, verken for frosset eller spritfiksert materiale kjørt direkte i PCR uten foregående DNA-ekstrasjon. Disse artene er så små at DNA-ekstrasjon med for eksempel DNA-isolerings-kit heller ikke var egnet.

Utvalgte PCR-produkter fra *Pareuchaeta norvegica*, *Chiridius armatus* og *Calanus helgolandicus* ble sekvensert og verifisert å være genet cytochrome oxidase-c subunit I (COI). Sekvensene ble alignet sammen med ~100 andre COI-sekvenser fra andre calanoide copepoder, som var det tilgjengelige antall sekvenser i GenBank molecular database. Et utvalg av sekvensene er vist i Figur 12 og et større utvalg finnes som Vedlegg I. Alignmentet viser stor variasjon mellom ulike arter, men variasjonen forekommer hovedsakelig i 3. kodonposisjon som vanligvis ikke fører til forandring av aminosyre. For eksempel var det innen slekten *Pareuchaeta* tilnærmet 17% forskjell i nukleotider mellom de ulike artene og innen slekten *Calanus* opptil 27% forskjell i nukleotider (Tabell 7).

Tabell 7. Andel nukleotidforskjeller mellom 7 arter calanoide copepoder basert på et ~600 bp langt område av mtCOI.

	<i>C. hyperboreus</i>	<i>C. glacialis</i>	<i>Pareuchaeta norvegica</i>	<i>P. antarctica</i>	<i>Metridia lucens</i>	<i>Pseudocalanus elongatus</i>	<i>Chiridius armatus</i>
<i>Calanus helgolandicus</i>	0,21	0,27	0,20	0,25	0,26	0,24	0,22
<i>C. hyperboreus</i>		0,26	0,21	0,20	0,25	0,22	0,21
<i>C. glacialis</i>			0,29	0,26	0,30	0,25	0,26
<i>Pareuchaeta norvegica</i>				0,17	0,28	0,20	0,21
<i>P. antarctica</i>					0,25	0,19	0,21
<i>Metridia lucens</i>						0,24	0,24
<i>Pseudo- calanus elongatus</i>							0,21

	10	20	30	40	50	60
<i>C. helgolandicus</i> B5	-TCAAGAATA	ATCGGTACGG	GACTCAGTAT	AATTATTCGT	CTAGAATTAG	GTCAAGC
<i>C. helgolandicus</i> AFG....
<i>P. norvegica</i> B11	...T..G...	G..T..G..A.	.NT.G..A..A	T.....
<i>P. norvegica</i> C7	...TG.....	G..T..G..A.	.TT.G..A..WA.TCG	A.....	.N.....
<i>P. norvegica</i> C10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C. armatus</i> B7	...GAG.AT	..T....A.	-.A..A..GA.....
<i>C. armatus</i> B9	...GAG.AT	..T....A.	.C..A..A.GA.....
<i>M. lucens</i>	.AG.G....	G..G..A..C.	.TT.A..GG.	CT.A.....G....	.C..GC.C..
<i>C. hyperboreus</i>	...G....G	..T..A..C.	.GT.G..G..A	T.....G.	.C..G..C..
<i>C. glacialis</i>	...TG.G...	..T..C..A.	.G..G....	G.....AGC.G.	.C.....A..
<i>P. elongatus</i>	.G..G....	..T....A.	.GT.G..A..	G.....A	A....GC...G..C..
<i>P. antarctica</i>	...G.T...	G..A....A.	..T..A..A.G	T...G..G.	.C.....A..

	70	80	90	100	110	120
<i>C. helgolandicus</i> B5	GTCTTTAATT	GGAGATGATC	AAGTRTATAA	CGTTGTAGTA	ACTGCACACG	CATTATTATT
<i>C. helgolandicus</i> AF	A.....
<i>P. norvegica</i> B11	C.....	..T..C....	..A.T.....	...A.T..T	..A..T..T.	.T.....
<i>P. norvegica</i> C7	C.....	..T..C....	..A.T.....	...A.T..T	..A..T..T.	.T..Y..Y..
<i>P. norvegica</i> C10	-----	---C....	..A.T.....	...A.T..T	..A..T..T.	.T.....
<i>C. armatus</i> B7	...A.....A.T.....	T..AA.T...	..A..T..T.	.G.....
<i>C. armatus</i> B9	...A.....A.T.....	T..AA.T...	..A..T..T.	.G.....
<i>M. lucens</i>G....C.	.GA.T..C..	T.....	..A....T.	.T.....
<i>C. hyperboreus</i>	C..A..G...GA.T..C..	..A..T...T..T.	.T.....
<i>C. glacialis</i>	C..AC.T..GGA.C.....	..A..G...	..A..C....	.G....C..
<i>P. elongatus</i>	...C....C	..G....C.	.GA.T.....	T....T..C	..A.....	.T....C..
<i>P. antarctica</i>	T.....	..G.....	.GA.T.....	T..A.T...	..G.....	.T.....

	130	140	150	160	170	180
<i>C. helgolandicus</i> B5	AATTTTTTTT	ATAGTTMTGC	CTATTTTAAT	TGGAGGATT	GGAAACTGAT	TGGTCCCTTT
<i>C. helgolandicus</i> AF	A...
<i>P. norvegica</i> B11	G.....A...	.A..C.T..T..T...	.A..A..C.
<i>P. norvegica</i> C7	G.....YA...	.A..C.T..T..T...	.A..A..C.
<i>P. norvegica</i> C10	G..G.....A...	.A..C.T..T..T...	.A..A..C.
<i>C. armatus</i> B7CAA.A.T..G.	.A..T..G..
<i>C. armatus</i> B9CAA.A.T..N.	.A..T..G.K
<i>M. lucens</i>G..AA.A.	.A.....	...G..C...T..G.	.A..A..C..
<i>C. hyperboreus</i>G..A...G...	...G.....T...	.A..G.....
<i>C. glacialis</i>	...C..C...AA.A.	.C..C....	...C..G...A..T.....
<i>P. elongatus</i>A.A.	.A.....	...G...	..T..T..G.	.A.....C.
<i>P. antarctica</i>A...C.T..	...G...	..T..T...A..C.

	190	200	210	220	230	240
<i>C. helgolandicus</i> B5	AATATTGGGT	GCAGCAGATA	TGGCATTTC	TCGTATAAAT	AATATAAGAT	TCTGGTTCTT
<i>C. helgolandicus</i> AF
<i>P. norvegica</i> B11	C.....GTW....	..A.....T..A..T..
<i>P. norvegica</i> C7	C.....GR..K....	..A.....T..A..T..
<i>P. norvegica</i> C10	C.....GC.....	..N.....T..A..G.N
<i>C. armatus</i> B7	...C.A..A	..T..T....C.C....G.A..T..
<i>C. armatus</i> B9	...C.A..A	..T..T....C.C....G.A..T..
<i>M. lucens</i>	...C.A..A	..T....C.	...T..C..	C..GC.G...	..C....G.	.T..A..T..
<i>C. hyperboreus</i>A..CC.....	A..A.....
<i>C. glacialis</i>	..G.....	..G..G..C.	...T..C..	C..A.....G..C.A..TC.
<i>P. elongatus</i>	T....A..GA..T..C.	A.....	..C..G..T.	.T..A..T..
<i>P. antarctica</i>	...G..A..AT....	.A.....	..A.....T..A..T..

	250	260	270	280	290	300
<i>C. helgolandicus</i> B5	AATGCCAGCT	TTAATTATAC	TTTTGTCAAG	ATCTCTGGTT	GAAAGGGGCG	CAGGTACTGG
<i>C. helgolandicus</i> AF
<i>P. norvegica</i> B11	...A..C..C	C.G.....	.C..A..T..T.T...A..G.	.T..G..A..
<i>P. norvegica</i> C7	...A..C..C	C.G.....	.C..A..T.ST.T...A..G.	.T..G..A..
<i>P. norvegica</i> C10	...A..C..C	C.G.....	.C..A..T..T.T...A..G.	.T..G..A..
<i>C. armatus</i> B7	...A..T..AC..GT	A..A.....	..GT.A..AT..G.A..A..
<i>C. armatus</i> B9	...A..T..AC..GT	A..A.....	..GT.A..AT..G.A..A..
<i>M. lucens</i>	.G.C..T...	..G.GC.C.	A..AA....	.G.AT.A..A	.G..A..G.	.C..C..G..
<i>C. hyperboreus</i>GC....	.GC.C....	G..AT.A..C	.G..T..G.G....
<i>C. glacialis</i>	T.....A	C....C..G.	.CC.A....	..CT.A..G	.G.....A..G..
<i>P. elongatus</i>	...A..T..C	C.....	.C.C.....	T....A...A....C..A..
<i>P. antarctica</i>	G..A.....ACC....T..	G...T.A..G	.G.....G.	.T..G..A..

COL-1875

	310	320	330	340	350	360
<i>C. helgolandicus</i> B5	GTGAACCGTG	TACCCCCCCC	TATCCAGAAA	TGTAGCCCAT	GCTGGAGCTT	CTGTCGATT
<i>C. helgolandicus</i> AFC..
<i>P. norvegica</i> B11	T....A...	..T..T..T.T.....	.A.C..G...GA.	.G..A....
<i>P. norvegica</i> C7	T....A...	..T..T..T.T.....	.A.C..G...GA.	.G..A....
<i>P. norvegica</i> C10	T....A...	..T..T..T.T.....	.A.C..G...GA.	.G..A....
<i>C. armatus</i> B7	T....T..TA..A.T..G..	CA.T.....G.G.Y	.AS.M....
<i>C. armatus</i> B9	T....T..TA..R.T..G..	CA.T.....G.G..	.A..A....
<i>M. lucens</i>	...G..T..CTT	.GG.A..T..	C..G..G...GAGC.G..C..
<i>C. hyperboreus</i>T..TG.A....	.A.T..A...	..A..G..A.	.C..A....
<i>C. glacialis</i>	T....T..T	..T..T...A..T..	.A.C..A...	..G..G....G....
<i>P. elongatus</i>	...G..T..TT..GTG..G..	.A.C..A..C	..A...GG.A..C..
<i>P. antarctica</i>	C.....A..C	..T..T..G.	.G..T..T..	.A.T..T...	T....G.G..A....

	370	380	390	400	410	420
<i>C. helgolandicus</i> B5	TGCTATTTT	TCGTACATT	TAGCTGGGT	GAGATCTATT	TTAGGGGCTG	TAAATTTTAT
<i>C. helgolandicus</i> AF
<i>P. norvegica</i> B11	...A.....	..A..G....C.....	T.....T.....
<i>P. norvegica</i> C7	k..A.....	..A..G....C.....	T.....T.....
<i>P. norvegica</i> C10	...A.....	..A..G....C.....	T.....T.....
<i>C. armatus</i> B7	Y..A.....	..TC.....C..T..	..T..A...R..A.	.T.....
<i>C. armatus</i> B9	...A.....	..TC....Y.C..T..	..T..A...A....	.T.....
<i>M. lucens</i>	C..C.....	..CC.T....	.G..A..T..	TTCT..C..C	.G....AA	.T.....
<i>C. hyperboreus</i>	C.....	..TC.T....	.G..C.....	T....A...	C.G....A.	.G..C....
<i>C. glacialis</i>C..C	..CC.G..C.C..A..	T..C..G..C	.G..T....
<i>P. elongatus</i>C	..TC.T....G.....	A.....CT..G.
<i>P. antarctica</i>TC.T....A.....	T..G.....G.....

	430	440	450	460	470	480
<i>C. helgolandicus</i> B5	TAGAACCCTT	GGCAATCTTC	GAGTGTTTGG	TATATTGCTT	GATCGAATGC	CTCTTTTGC
<i>C. helgolandicus</i> AFT.....
<i>P. norvegica</i> B11	C....AT.G	..T..T.A.A..C.A	A.....T.AG.T.	.C..G....
<i>P. norvegica</i> C7	C....AT.G	..T..T.A.A..C.A	A.....T.AG.T.	.C..G....
<i>P. norvegica</i> C10	C....AT.G	..T..T.A.A..C.A	A.....T.AG.T.	.C..G....
<i>C. armatus</i> B7	...T..AT.A	..A..T.A.A..AAC.TT.AA.	.AT.A....
<i>C. armatus</i> B9	...T..AT.A	..A..T.A.A..AAC.TT.AA.	.AT.A....
<i>M. lucens</i>	...G..TT.A	..A..C..C.A.....	G....TT.A	.C.....	.CT.A..C..
<i>C. hyperboreus</i>AT.GT.G.	.G..A.....AT.A	.C.....	.AT.G....
<i>C. glacialis</i>	...T..TT.G	..G..C....	.T.....C.TT.A	.C..T....	.A..A....
<i>P. elongatus</i>	...T..TT.A	..T..T.A.A.....	C...C.TT.AAG..A.	.AT.A....
<i>P. antarctica</i>	...T..TT.A	..A.....T.ATG.C.	.AT.A..C..

COI-2026		490	500	510	520	530	540
<i>C. helgolandicus</i> B5	CTGGGCTGTT	CTAATTACTG	CGGTTTACT	TCTTTTATCT	CTCCCTGTTT	TGGCCGGGGC	
<i>C. helgolandicus</i> AFC.....	
<i>P. norvegica</i> B11	T...T...G	T.....G.	.A...C.CT.	A..A..G...	..G..C..G.	.A.....	
<i>P. norvegica</i> C7	T.....	
<i>P. norvegica</i> C10	T...T...G	T.....G.	.A...C.CT.	A..A..G...	..G..C..G.	.A.....	
<i>C. armatus</i> B7	A..AT.....	T.G.....A.	.TA..Y....	A.....A	..A.....	...T....	
<i>C. armatus</i> B9	A..AT.....	T.G.....A.	.TA..C....	R.....A	..A.....	...T....	
<i>M. lucens</i>	T....A..A	T....C..AA	.TA.....	C..CC.T..CA.....	
<i>C. hyperboreus</i>	T..A.....	T.....	.A..C...T.	AT.A..G..A	..A..G..A	.A....T..	
<i>C. glacialis</i>	T....G..A	..C.....C.	.T..CC.T..	C..A....A	T.A..C..CC	.A..A..A..	
<i>P. elongatus</i>	G...T...A	T..G.A..G.	.TA..C.TT.	A..AC.G..C	T.A..C..C.	.A..T..A..	
<i>P. antarctica</i>	G..AT....A	T....C....	.A..AC.TT.	A..G..G...	T.G.....GC	.A..T.....	
		550	560	570	580	590	
<i>C. helgolandicus</i> B5	AATTACAATA	CTACTTACAG	ACCGAAACCT	AAATACGACA	TTTATGATG		
<i>C. helgolandicus</i> AFC....		
<i>P. norvegica</i> B11	C.....T...	..TT.A....	.T.....T.	...C..AG.k		
<i>P. norvegica</i> C7		
<i>P. norvegica</i> C10	C.....T...	T..T.A....	.T.....T.	...C.GC.AC		
<i>C. armatus</i> B7	T....T..G	..CT.A..T.	.T.....T..	..Y..TT.T		
<i>C. armatus</i> B9	T....T..G	..CT.A..T.	.T.....T..	..Y..TT.T		
<i>M. lucens</i>C...	T..T.A....T.T..T	..C.....C.		
<i>C. hyperboreus</i>	T.....	..CT.A..C.	.T..G..TT.	G..C..TT..	..C.....		
<i>C. glacialis</i>	T..C..C...	T..T.A....	.T.....		
<i>P. elongatus</i>	T....T...	T..T.A....	.T.....TT.TT.T		
<i>P. antarctica</i>T...	..T.A....	.T..T..TT.A..T		

Figur 12. Cytochrome oxidase subunit I-nukleotidesekvenser fra *Calanus helgolandicus* individ B5 (egen sekvens), *C. helgolandicus* (AF 332760), *Pareuchaeta norvegica* individ B11, C7 og C10 (egne sekvenser), *Chiridius armatus* individ B7 og B9 (egne sekvenser), *Metridia lucens* (AF 474106), *Calanus hyperboreus* (AF 332770), *C. glacialis* (AF 333039), *Pseudocalanus elongatus* (AY 144467) og *Pareuchaeta antarctica* (AF 531748). Prikker står for identiske nukleotider i en gitt posisjon sammenlignet med *C. helgolandicus*. Annealing-posisjonen til den artsspesifikke primeren for *C. helgolandicus*, COI-2026 samt for primeren COI-1875 og COI-1578, er understreket. Nukleotide # 1 korresponderer til posisjon 1542 i den publiserte *Drosophila yakuba*-sekvensen (X03240) (Clary og Wolstenholme, 1985).

3.6.2 Diskriminering mellom calanoide copepoder ved bruk av artsspesifikk PCR

Bucklins artsspesifikke primer for *C. helgolandicus*, COI-1578 (Bucklin et al., 1999) sammen med den universelle primeren LCO-1490, amplifiserte også DNA fra *Chiridius armatus*, *Pareuchaeta norvegica*, *Metridia longa* og *Conchoecia elegans*, selv ved de modifiserte betingelsene beskrevet i 2.5.1 (Figur 13). Templat DNA var COI-framenter som man fikk ved å bruke de universelle COI-primerne LCO-1490 og HCO-2198. Det amplifiserte produktet var 128 bp langt.

Figur 13. Spesifisitet til *Calanus helgolandicus*-primeren COI-1578. Agarose-gel med amplifikasjonsprodukter oppnådd ved å benytte LCO-1490 og COI-1578 som spesifikke PCR-primere. Templat-DNA var COI-framenter som man fikk ved å bruke de universelle COI-primerne LCO-1490 og HCO-2198. Bane 1 markør (Hinf I). Bane 2 *Calanus helgolandicus*, bane 3 negativ kontroll uten templat-DNA, bane 4 og 5 *Chiridius armatus*, bane 6 og 7 *Pareuchaeta norvegica*, bane 8 og 9 *Metridia longa*, (alle Copeoda, Calanoida). Bane 10 og 11 *Conchoecia elegans* (Ostracoda). COI-1578 sammen med LCO-1490 var således ikke spesifikk for *Calanus helgolandicus* under forholdene beskrevet i 2.5.1.

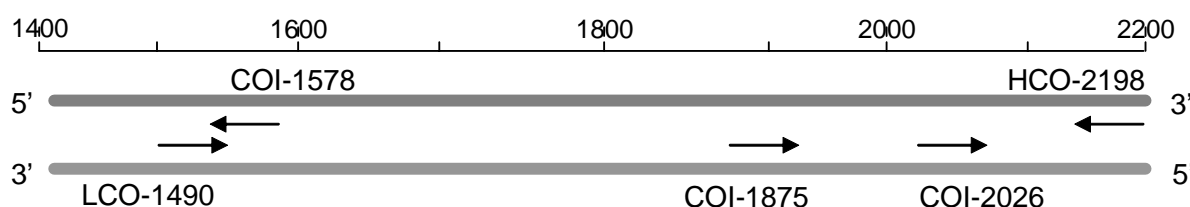


Det ble derfor med utgangspunkt i alignmentet vist i Vedlegg I utformet to alternative primere. Brukt sammen med den universelle primeren HCO-2198 var disse primere forventet å være spesifikke for *Calanus helgolandicus* utfra at de oppfylte kravene opplistet i 2.5.4 i tillegg til at det ikke kom opp andre zooplanktonarter enn *C. helgolandicus* ved BLAST-søk på primerene.

COI-1875: 5' AGC CCA TGC TGG AGC TTC 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$ og

COI-2026: 5' GGC TGT TCT AAT TAC TGC GG 3' $T_m = 60^\circ\text{C}$

Primernes plassering på COI er vist i Figur 12 og 14. Navnet på primerne kommer av posisjonsnummeret fra *Drosophila yakoba*-sekvensen (Clary og Wolstenholme, 1985).



Figur 14. Skjematisk tegning over del av Cytochromoksidase C subunit I (COI) med markering av annealingsposisjonene til primerne LCO-1490, HCO-2198, COI-1578, COI-1875 og COI-2026. Tallinjen markerer nukleotidennummer i forhold til den publiserte *Drosophila yakuba*-sekvensen (X03240).

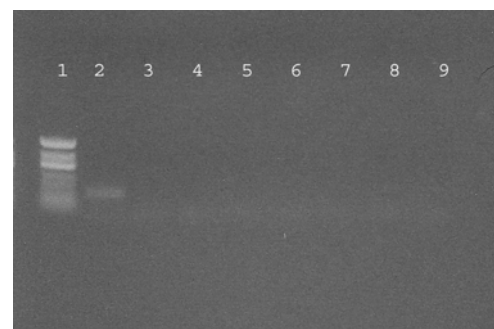
Primeren COI-1875 sammen med HCO-2198 syntes ikke å diskriminere mellom de ulike copepodene (Figur 15). De ga et ~345 basepar langt amplifikasjonsprodukt med COI-fragmenter fra både *C. helgolandicus*, *Pareuchaeta norvegica*, *Chiridius armatus* og *Metridia longa* som templat-DNA, selv ved strenge reaksjonsforhold. COI-fragmenter var fått ved å bruke de universelle COI-primerne LCO-1490 og HCO-2198. PCR-programmet som ble benyttet var det samme som for de artsspesifikke primerene (se 2.5.8), bortsett fra at annealingtemperaturen ble senket fra 68 til 62 °C.

Figur 15. Spesifisitet til *Calanus helgolandicus*-primeren COI-1875. Agarose-gel med amplifikasjonsprodukter som man fikk ved å benytte HCO-2198 og COI-1853 som spesifikke PCR-primerer. Templat-DNA var COI-fragmenter oppnådd ved å bruke de universelle COI-primerne LCO-1490 og HCO-2198. Bane 1 markør (Hinf I). Bane 2 *Calanus helgolandicus*, bane 3 *Pareuchaeta norvegica*, bane 4 *Metridia longa*, bane 5 *Chiridius armatus*, bane 6 *Temora longicornis* (alle Copeoda, Calanoida). Bane 7 negativ kontroll uten templat-DNA. COI-1853 sammen med HCO-2198 var, under forholdene som ble benyttet, ikke spesifikk for *Calanus helgolandicus*.



Primeren COI-2026 sammen med HCO-2198 fungerte som spesifikke *C. helgolandicus*-primere ved bruk av ”touch down PCR” som beskrevet i protokollen for spesifikke primere (2.5.8). Kun COI-fragmenter fra *C. helgolandicus* som templat DNA ga synlig bånd på gel, COI-fragmenter fra *Chiridius armatus*, *Pareuchaeta norvegica*, *Metridia longa*, *Temora longicornis*, *Conchoecia elegans* og *Oithona similis* ble ikke videre amplifisert (Figur 16). Amplifiseringsproduktet var ~172 basepar langt.

Figur 16. Spesifisitet til *Calanus helgolandicus*-primeren COI-2026. Agarose-gel med amplifikasjonsprodukter som man fikk ved å benytte HCO-2198 og COI-2026 som spesifikke PCR-primerer. Templat-DNA var COI-fragmenter som jeg fikk ved å bruke de universelle COI-primerne LCO-1490 og HCO-2198. Bane 1 markør (Hinf I). Bane 2 *Calanus helgolandicus*, bane 3 *Pareuchaeta norvegica*, bane 4 *Metridia longa*, bane 5 *Chiridius armatus*, bane 6 *Temora longicornis* (Copeoda, Calanoida). Bane 7 *Conchoecia elegans* (Ostracoda) og bane 8 *Oithona similis* (Copepoda, Cyclopoida). Bane 9 negativ kontroll uten templat-DNA. Ved å bruke COI-2026 og HCO-2198 som spesifikke primere, ble ~190 bp av mtCOI-genet amplifisert kun for *C. helgolandicus*.



3.6.3 Analyse av fekalpelleter

Byttedyr-DNA fra fekalpelleter fra dyr fanget om natta om høsten og som hadde vært inkubert enkeltvis, ble amplifisert ved hjelp PCR-protokollene beskrevet i 2.5.8. Tre av femten peller som ble undersøkt ga amplifiseringsprodukt ved bruk av de spesifikke primerne COI-2026 og HCO-2198 (Tabell 8, Figur 17). Direkte sekvensering av dette PCR-produktet og BLAST-analyse i GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), bekreftet at PCR-produktet var COI fra *C. helgolandicus*.

Tabell 8. Antall fekalpelleter fra *Pareuchaeta norvegica* med *C. helgolandicus*-DNA.

Dyp	Antall peller undersøkt	Antall peller påvist innhold av <i>C. helgolandicus</i> -DNA
100-50 m	10	1
150-200 m	5	2

I tillegg ble 9 fekalpelleter fra dyr fanget om våren undersøkt for tilstedeværelse av *C. helgolandicus*-DNA, men ingen av disse ga amplifiseringsprodukt som var synlig på agarosegel (Figur ikke vist).

Figur 17. Analyse av fekalpelleter. Agarose-gel med amplifikasjonsprodukter oppnådd ved å bruke HCO-2198 og COI-2026 som spesifikke PCR-primere. COI-fragmenter fra PCR med de universelle COI-primere LCO-1490 og HCO-2198 var templat-DNA. Bane 1 markør (Hinf I). Bane 2-15 individuelle peller fra *Pareuchaeta norvegica*, bane 16 negativ kontroll (generelt PCR produkt fra *P. norvegica*), bane 17 positiv kontroll (generelt PCR produkt fra *C. helgolandicus*). Sekvensering og BLAST-søk verifiserte at produktene var rent *C. helgolandicus*-DNA.



4 Diskusjon

4.1 Vertikal fordeling av *Pareuchaeta norvegica*

Resultatene både høst og vår viste at de fleste voksne hunnene av *Pareuchaeta norvegica* oppholdt seg dypt i vannsøyla, en del oppholdt seg i den midtre delen, nesten ingen var høyt oppe om våren, mens noen svært få individer var høyt i vannsøyla natterstid om høsten. Det var ingen forskjell i veid middeldyp mellom dag og natt om våren, mens det om høsten var en litt dypere fordeling om dagen sammenlignet med om natta.

4.1.1 Vertikalt fordelingsmønster i lys av innsamlingsmetode

Både mulig tap gjennom grove masker, unnvikelsesadferd og innsamling i et sund med store strømmer gjør absoluttverdiene usikre (f.eks. Aksnes og Blindheim, 1996). Resultatene både vår og høst viste relativt stor variasjon i antall individer per m³ i de ulike dybdeintervallet for de ulike seriene. Fordelingsmønsteret var allikevel det samme for alle seriene, slik at bildet av vertikalfordelingen anses som reelt.

4.1.2 Vertikalt fordelingsmønster i lys av hydrografiske parametre

P. norvegica unngikk nesten totalt det øverste dybdeintervallet både vår og høst. Det var brakt vann (salinitet < 30) helt ned til 23 m om våren, mens om høsten var saliniteten i overflata 31,2. Men i og med at svært få individer også ble fanget i dybdeintervallet 50-100 m, der saliniteten var tilnærmet forholdene i dypet, i tillegg til at *P. norvegica* er vist å unngå de øverste 50 meterne også under andre hydrografiske betingelser (Skarra og Kaartvedt, 2003), er det lite trolig at saliniteten styrte vertikalfordelingen.

Den samme argumentasjonen gjelder for temperaturen, som derfor heller ikke antas å ha betydd mye for det vertikale fordelingsmønsteret. Copepoder har riktignok lavere vekstrate ved lavere temperaturer (Frost, 1988; Ohman, 1990; Ohman et al., 1983), og både byttedyr og *P. norvegica* burde derfor søke mot varmere vannlag. Det var kaldt overflatevann om våren og varmt overflatevann om høsten. Dette kunne både indirekte og direkte ha vært en medvirkende årsak til hvorfor nesten ingen *P. norvegica* ble fanget i det øverste dybdeintervallet om våren og hvorfor det var noen få der om høsten, men en vesentlig styringsfaktor var temperaturen trolig ikke.

Under henholdsvis 40 m (vår) og 75 m (høst), var de hydrografiske gradientene (saltholdighet-, temperatur- og tetthetsgradientene) svake og kan ikke ha hatt stor betydning for den observerte fordelingen.

4.1.3 Døgnvandring

Med en total kroppslengde på hele 9 mm, er *Pareucaheta norvegica* utsatt for visuelle predatorer (Brooks og Dodson, 1965; O'Brien, 1987) og forventes å oppholde seg i dypet om dagen for å unngå predasjon (Dodson, 1990). Om natta er det forventet at individene vil vandre opp for å spise når mattilgangen er bedre høyere opp i vannsøyla. Skarra og Kaartvedt (2003) undersøkte vertikalfordelingen til *P. norvegica* ved Elle gjennom et helt år og fant at *P. norvegica* der til en viss grad fulgte en døgnlig rytme for opp- og nedvandring, men at vertikalvandringen var lite framtreddende både i april og november. Resultatene i denne oppgaven er i samsvar med dette.

Om våren var veid middeldyp om dagen ikke signifikant forskjellig fra veid middeldyp om natta, verken for alle hunner sett samlet eller modnende hunner, hunner med eggpakke og umodne hunner sett hver for seg. Innsamlingsmetoden som ble benyttet gir ikke oppløsning på individnivå. Det er tidligere vist at populasjonsdypet kan være en dårlig indikator på det enkelte individets adferd, da enkeltindivider kan vandre mer enn det som framkommer av hele populasjonens fordeling (Gibbons, 1993; Lomnicki, 1980; Pearre, 1979). Det kan ikke utelukkes at enkeltindivider kan ha beveget seg opp mot overflata om natta. Korttidsbevegelser opp i øvre lag er observert for copepoder (Simard et al., 1985) og om høsten ble noen få individer fanget i de øvre 50 meterne tidlig på natta. Flere enkeltindivider av *P. norvegica* kan ha vandret raskt opp til overflata for å spise, og deretter umiddelbart gått ned i dypet igjen for å unngå predatorer. Skarra og Kaartvedt (2003) fant ved to tilfeller lav byttedyrkonsentrasjon mellom 100-50 m, men allikevel høy pelletproduksjon hos individer fanget i dette dybdeintervallet, og satte dette i sammenheng med slike hurtige næringsvandring.

Det kan også tenkes at vandringsamplituden for en øvre subpopulasjon med DVM kan ha vært mindre enn det som lot seg detektere ved sampling i 50-meters-intervaller. Men *P. norvegica* er tidligere vist å kunne ha DVM med vandringsamplitude på flere hundre meter (Longhurst og Williams, 1979).

4.1.4 Vertikal fordeling i forhold til føde

Eksperimentelle studier har vist at adulte *Pareuchaeta* spp. er mest effektive til å fange byttedyr med størrelse tilnærmet 1 mm (Shuert og Hopkins, 1987; Yen, 1982, 1983, 1991). Copepoder av denne størrelsen som var til stede ved Elle i de aktuelle tidsrommene inkluderte voksne *Microcalanus pussilus*, *Oithona atlantica*, *O. similis*, *Paracalanus parvus*, *Acartia clausi*, *A. longiremis* og *Pseudocalanus* spp. (Enckell, 1980; Sars, 1903) i tillegg til nauplier og juvenlie former av de andre artene. Det var flest slike små byttedyr over 50 m både natt og dag, både vår og høst. Allikevel oppholdt de fleste voksne hunnene seg alltid i dybdeintervallet 200-150 m. Dette tilsvarer også hva som ble funnet av Skarra og Kaartvedt (2003) gjennom et helt år. Disse resultatene kan tyde på at det var andre faktorer enn fødefordelingen som regulerte vertikalfordelingen til *P. norvegica*. Men det kan heller ikke utelukkes at det kan ha vært tilstrekkelig med mat i dypet, selv om konsentrasjonen av små byttedyr var lavere der. En vandring opp ville da ikke gi nok gevinst i form av bedre mattilgang på bekostning av økt fare for selv å bli spist. Voksne *P. norvegica* er i stand til også å håndtere byttedyr større enn 1 mm som for eksempel voksne *Calanus* spp. og fiskelarver (Olsen et al., 2000; Ottesen, 1995; Yen, 1987), og særlig *Calanus helgolandicus* var vanlig under 100 m. Analysen av fekalpelleter (se 4.3) viste at individer i dypet hadde spist *C. helgolandicus*. Men pelletproduksjonen både om våren og om høsten var lav i forhold til hva som er funnet i tilsvarende, tidligere studier (Skarra og Kaartvedt, 2003), noe som muligens kan tyde på at individene var fødebegrenset. *P. norvegica* har store første antenner som brukes i lokaliseringen av bytte. Eksperimentelle studier kan dessuten tyde på at byttets adferd (bevegelig eller ubevegelig), heller enn størrelse er avgjørende for *P. norvegicas* predasjonssuksess (Olsen et al., 2000; Yen, 1987). Vertikalfordelingen av ”bevegelige byttedyr” i forhold til ”ubevegelig byttedyr”, ble ikke undersøkt.

4.1.6 Vertikal fordeling i lys av modenhetsgrad og livsstadium

Resultatene om våren viste at hunner med eggpakke og modnende hunner oppholdt seg nede i dypet, mens umodne hunner oppholdt seg høyere i vannsøyla. Dette er i samsvar med tidligere undersøkelser som har vist at modnende hunner og hunner med eggpakke, både hos *P. norvegica* og en nær slektning *P. elongata*, har vært fraværende i de øvre vannmassene (Bollens og Frost, 1991b; Yen, 1983) og dette er også vist for andre copepodearter (Vuorinen et al., 1983). Det er et kjent fenomen at planktonspisende fisk foretrekker modnende hunner og hunner med eggpakke eller eggsekk framfor umodne (Bollens og Frost, 1991b;

Dawidowicz og Loose, 1992; Gliwicz, 1986; Hairston et al., 1983; Sandstrom, 1980; Vuorinen et al., 1983; Winfield og Townsend, 1983). Modnende hunner og hunner med eggpakke vil dermed løpe større predasjonsrisiko ved opphold i den øvre delen av vannsøyla enn de umodne hunnene. Og resultatene passer med predasjonsunngåelseshypotesen, som predikerer at individer som lett oppdages og blir spist av visuelle predatorer vil oppholde seg nede i dypet (Zaret og Suffern, 1976).

Om høsten ble det nesten ikke fanget noen modnende hunner eller hunner med eggpakke, og resultatene viste at de juvenile hadde en grunnere fordeling enn de voksne. Dette er også i samsvar med hva som tidligere er funnet for *P. norvegica* (Bakke, 1977; Fleddum et al., 2001; Viken, 1995) og er også kjent hos andre arter (Goodson et al., 1995; Hays, 1995). I og med at voksne hunner er større enn de juvenile stadiene, er de lettere observerbare for visuelle predatorer (Brooks og Dodson, 1965). Modellstudier viser dessuten at verdien av økt mattilgang og vekst for økt fitness kan være ulik for juvenile og voksne individer gitt at individene må nå en viss størrelse før de er i stand til å reproducere. For de juvenile er vekst viktig slik at de når reproduktiv størrelse. For voksne individer, som allerede er store nok til å utvikle gonader, er det viktigere at de overlever til reproduksjonen er unnagjort snarere enn å vokse mer. Juvenile forventes derfor å være mer villige enn voksne individer til å utsette seg for predasjonsfare gitt at denne kan kompenseres for med bedre mattilgang (se Giske og Aksnes (1992)). Men variasjon i tørrvekt hos eggene hos *P. norvegica* er vist å være sterkt relatert til økt tørrvekt hos hunnen (Nemoto et al., 1976), så også voksne hunner kan tjene på å bygge opp fettreservene.

Det er også forskjell i diett mellom voksne hunner og copepoditter. Copepodittene tar mindre byttedyr enn de voksne (Ottesen, 1995; Øresland og Ward, 1993). Tettheten av små byttedyr (< 1 mm) var størst i den øverste delen av vannsøyla, mens man i dypet hadde en større andel store byttedyr, slik at mattilbudet i dypet relativt kan ha vært dårligere for copepodittene enn for de voksne.

4.1.7 Vertikal fordeling i lys av kondisjon

Hays et al. (2001b) viste at individuell variabilitet i DVM hos copepoden *Metridia pacifica* til dels kunne forklares ut fra forskjeller i kondisjon hvor individer med store lipidreserver ikke tok risikoen ved å gå opp til overflata for å spise om natta. Noe av det samme kan synes å være tilfelle også hos *P. norvegica* da resultatene både vår og høst viste at det var en trend at

individene som befant seg i den øvre delen i vannsøyla hadde kortere prosom, lavere tørrvekt og også lavere tørrvekt/lengde-forhold samt mindre fettsekk (bare vår) enn de som oppholdt seg lengre ned, selv om de individuelle forskjellene blant dyr fanget i det samme dybdeintervallet også var store.

At individene av *P. norvegica* i dypet var signifikant kortere enn dyr med en grunnere vertikal plassering ble også funnet av Mauchline (1992; 1995) og fenomenet er vist for andre copepodarter, eksempelvis *Metridia pacifica* (Hays et al., 2001b). Men forskjellene i lengde mellom individene som oppholdt seg nær overflata og de som oppholdt seg nærmere bunn var svært liten i absolutte verdier (~2%), og kan vanskelig antas å ha hatt særlig stor betydning for predasjonsrisikoen. Dette var også tilfelle for *M. pacifica* (Hays et al., 2001b).

Mer iøyenfallende, i likhet med hva også Hays et al. (2001b) fant for *M. pacifica*, var de individuelle forskjellene i tørrvekt og forholdet mellom tørrvekt og lengde. For *P. norvegica* var forskjellene i absolutte verdier her i størrelsesorden 20-60%. Forholdet mellom tørrvekt og lengde antas å være en god indikator på et individs kondisjon og Båmstedt (1975) har vist at lipidkonsentrasjon hos *P. norvegica* økte med økt tørrvekt. Ut fra resultatene er det derfor rimelig å anta at individene som oppholdt seg i den øvre delen av vannsøyla kan ha hatt større motivasjon for fødesøk på grunn av lave lipidreserver enn individene som oppholdt seg nær bunn. Antakelsen forsterkes av at det samme mønsteret med lavere verdier for gruntlevende individer om våren også ble funnet ved måling av fettsekkene. *P. norvegica*, i likhet med andre calanoide copepoder, lagrer energi hovedsakelig i fettsekken. Selv om mengden av lipider og også lipidklasser kan analyseres ved hjelp av biokjemiske teknikker, er det vist at enkel lineær måling av fettsekken fungerer som et godt mål på lipidreservene (Miller et al., 1998).

Den bedre kondisjonen til de dyptlevende individene var trolig ikke et resultat av at de holdt til dypere, tatt i betraktning den lavere byttedyrtettheten i dypet både vår og høst. I tillegg var fødeaktiviteten var betydelig lavere hos de dyptlevende individene om høsten (om våren var forskjellen i fødeaktivitet med hensyn på dyp ikke signifikant). Mer sannsynlig har individene oppholdt seg høyere i vannsøyla tidligere i livet og så søkt ned i dypet etter at de hadde vokst seg store og bygd energireserverne tilstrekkelig opp. Vårdataene, med dypere vertikal plassering for modnende hunner og hunner med eggpakke i forhold til umodne hunner, kan tyde på at *P. norvegica* går ned i dypet når den har oppnådd tilstrekkelig energireserver til å

sette i gang med reproduksjon og blir værende i dypet så lenge eggene gjør den til et lett synlig bytte.

Sammenligningene av kondisjonsparametre mellom hunner av ulik modenhetsgrad, viste at det bare var signifikante forskjeller i prosomlengde. Tørrvekt, tørrvekt/total lengde-forholdet og volum av fettsekken var ikke korrelert med modenhetsgrad.

Det var om våren ikke mulig å påvise noen forskjell i kondisjon med hensyn på dyp innen gruppen umodne hunner. Definisjonen benyttet i denne oppgaven for hva som skulle anses å være en umoden hunn, var en hunn uten eggpakke eller blå, synlige modnende egg i oviducten. Gruppen kalt umodne hunner kan ha bestått av en blanding av hunner som var klare til å reprodusere og hunner som nettopp hadde reprodusert (Bollens og Frost, 1991b; Nemoto et al., 1976). Lipidkonsentrasjonen hos hunner av *P. norvegica* påvirkes av modenhetsgraden (Båmstedt, 1975). Under eggutviklingen overføres mye energi fra hunnen til eggene (Blades-Eckelbarger, 1991; Båmstedt, 1979). Det er dermed som forventet større varians i kondisjonsparametre innen gruppen umodne hunner enn i gruppen av hunner med eggpakke og modnende hunner.

Resultatene viste også til dels store forskjeller i kondisjonsparametrene mellom vår og høst, med dårligst kondisjon for individene fanget om våren (lavest tørrvekt, lavest tørrvekt/total lengde-forhold, men større fettsekk). *P. norvegica* er tidligere vist å ha størst lipidinnhold om høsten etterfulgt av gradvis mindre og mindre lipidreserver mot våren (Båmstedt og Matthews, 1975). Resultatene i denne oppgaven kan derfor synes å passe med tidligere undersøkelser. Men da det kun ble foretatt én vårinnsamling og én høstinnsamling i tillegg til at det ikke foreligger tidligere målinger av kondisjonen hos *P. norvegica* i forhold til årstid fra Oslofjorden, diskuteres disse forskjellene ikke nærmere.

4.1.8 Vertikal fordeling i forhold til pigmenteringsgrad

P. norvegica er beskrevet å ha et variabelt, men alltid høyt innhold av karotenoider (Fisher et al., 1952) og pigmenteringen er særlig sterk ved munnpartiet (Sars, 1903). Men mange av individene fanget over 100 m var nesten helt gjennomsiktige og manglet den kraftige, røde pigmenteringen som karakteriserte individene fanget dypere. Inkubering av dyr i mørket viste imidlertid at pigmenteringsgraden var meget plastisk, og endret seg raskt i forhold til lysforholdene i omgivelsene. Evne til å endre pigmenteringsgrad kan være et viktig tilpasningstrekk for dyr som opplever skiftende vertikal plassering og lysregimer.

Pigmentering er en avgjørende faktor for hvor synlig et krepsdyr er (Zaret og Kerfoot, 1975) og liten grad av pigmentering kan være et tilpasningstrekk for å unngå visuelle predatorer (Batty et al., 1990; Checkley, 1982; Hays, 1996; Hays et al., 1994; James og Findlay, 1989; Sandstrom, 1980; Vuorinen et al., 1983). Størst fokus i dette studiet på hvordan dyrene unngår predasjon, har vært på vertikalfordelingen. Men disse resultatene viser at dyrene har flere strenger å spille på.

4.2 Fødeaktivitet

Resultatene viste til dels stor variasjon i antall pelleter produsert innen ett og samme dybdeintervall. Det var allikevel forskjell mellom dag og natt om våren, og forskjell i antall med hensyn på dyp om høsten.

4.2.1 Pelletproduksjon som estimat for fødeaktivitet – metodiske vurderinger

Selv om dyrene ble håndtert så rakst som mulig, tok det noe tid fra dyrene ble fanget i håven til de var overført til inkuberingsrøret. Dyrene kan ha rukket å kvitte seg med pelleter under innsamlingen, og dette gjelder i litt større grad dyrene fanget i de dypeste intervallene der det var flest dyr.

Det ble registrert forsøk på predasjon i samlekoppen på håven og i bakken rett etter at prøven var tatt om bord, men dette antas ikke å ha påvirket resultatene i særlig stor grad, da det tar noe tid for *P. norvegica* å håndtere et bytte og det maksimalt varte 15 min fra nettet ble lukket til alle copepodene var overført til inkuberingsrøret. Svært få av copepodene ble observert med bytte i det de ble overført. På noen av filtrene ble det likevel registrert copepoderester. Gjennomsnittlig anslag for antall pelleter produsert var både vår og høst lavere enn hva Skarra og Kaartvedt (2003) beregnet, og lavere enn hva som ble funnet av Kaartvedt et al. (2002). Pelletene ble telt manuelt en gang. Skarra (1999) fant at forskjellen mellom førstegangs og andregangs opptelling var liten, men det kan ikke utelukkes at pelleter kan ha blitt oversett. Dette burde uansett ikke ha stor betydning for fordelingsmønsteret.

Å bruke antall pelleter som indikator på fødeinntak, forutsetter at det er en god korrelasjon mellom hvor mange byttedyr som har blitt konsumert og pelletproduksjonen. (Lampitt et al., 1990) hevdet at copepoder kunne produsere pelleter selv uten fødeopptak, men Olsen et al. (2000) og Tiselius et al. (1997) viste at korrelasjonen mellom fødeaktivitet og pelletproduksjon hos *P. norvegica* var god, selv om forholdstallet varierte noe (*P. norvegica* produserte vanligvis mellom 0,5 og 1 pellet for hvert konsumerte bytte).

Umodne hunner ble ikke skilt fra modnende hunner eller hunner med eggpakke under inkuberingen om våren, og dette kan ha vært en medvirkende årsak til den store variasjonen i pelletproduksjon som ble funnet.

4.2.2 Pelletproduksjon som funksjon av tid og dyp

Det var ingen sammenheng mellom dyp og antall pelleter produsert om våren. Det var derfor ikke mulig å påvise at individene som oppholdt seg i den øvre del av vannsøyla hvor det var stor fare for å bli spist, på denne tiden av året oppveide for den økte predasjonsrisikoen ved å selv fange mer bytte. Pelletproduksjonen om natta var lavere sammenlignet med om dagen, og dette er motsatt av hva som tidligere har blitt funnet for *P. norvegica*, både i feltstudier (Skarra og Kaartvedt, 2003) og eksperimentelle studier (Olsen et al., 2000), selv om Skarra og Kaartvedt (2003) under en av to vårinnsamlinger ikke fant signifikante forskjeller mellom dag og natt. *P. norvegica* bruker mekanoreseptorer for å lokalisere byttet og er ikke avhengig av lys for å fange byttedyr (Yen, 1987). Individuer med fylt tarm er lettere å se, og selve spiseaktiviteten antas også å øke faren for å bli oppdaget. Det burde være en fordel å heller ha høyest fødeaktivitet om natta når faren for å bli oppdaget av visuelle predatorer er minst. Trenden med flere pelleter produsert om dagen versus om natta var den samme for alle dybdeintervallene, så resultatene kan ikke forklares med kontinuerlig høy spising i dypet hvor det alltid var mørkt. Den signifikante forskjellen med høyere dagverdier enn nattverdier, kan tenkes å bare skyldes tilfeldigheter.

Om høsten var det ingen signifikant forskjell i pelletproduksjonen mellom dag og natt, og dette fant heller ikke Skarra og Kaartvedt (2003) under den ene av to høstinnsamlinger. Men individene produserte færre pelleter jo dypere de hadde blitt fanget. Dette kan, sett i sammenheng med at individene høyt oppe hadde lavere kondisjon, tyde på at individene der var mer motivert for å spise eller forskjellene kan skyldes at individene som oppholdt seg nær overflata hadde bedre tilgang på byttedyr enn individene som befant seg dypere. Lavere pelletproduksjon i dypet i forhold til høyere opp om høsten er også tidligere vist av Kaartvedt et al. (2002).

De fleste copepodene både om våren og høsten hadde ikke produsert pelleter. *P. norvegica* kan på grunn av fettreserver overleve uten mat i minimum to måneder, og er ikke avhengig av å ta til seg føde hver dag (Båmstedt og Holt, 1978).

4.3 Analyse av fekalpelleter ved bruk av artsspesifikk PCR

Et mål med denne delen av oppgaven var å finne ut om det var praktisk mulig å bruke artsspesifikk PCR med etterfølgende kontroll av produktet på agarosegel for å bestemme hva karnivore copepoder hadde spist. Resultatene viste at fekalpelleter kan inneholde nok intakt bytte-DNA til at dette lar seg gjøre. En individuell pellet var tilstrekkelig for å få amplifikasjonsprodukt som kunne påvises ved agarosegel-elektroforese.

4.3.1 Tolking av negative resultater

Tre forhold må tas i betraktning når man skal tolke negative resultater. Det første gjelder kvaliteten av DNAet i fekalpelleter. De fleste pelletene som ble undersøkt, ga ikke amplifikasjonsprodukt ved bruk av artsspesifikke *Calanus helgolandicus*-primere. Dette betyr nødvendigvis ikke at denne byttedyrarten ikke var spist. I teorien er en eneste kopi av hvilket som helst gen (eller DNA-område) nok for å få oppformering ved hjelp av PCR (Palumbi, 1996), men det er nødvendig at genet (eller DNA-området) er intakt. Dette trenger ikke alltid å være tilfelle for byttedyr-DNA i fekalpelleter. Zooplankton inneholder mye DNaser, RNaser og proteaser (Bucklin et al., 2000b) som kan tenkes å bli frigjort i byttet når det blir spist. I tillegg kan enzymer i *P. norvegicus* mage og tarm tenkes å ødelegge bytte-DNAet (Mayzaud, 1986).

Det andre forholdet går på kvantiteten av bytte-DNA i fekalpelleter. Byttedyr-DNA trenger ikke å være til stede i pelleten. Pelleater er tidligere vist å inneholde hovedsakelig skallrester (Fleddum et al., 2001), men selve krepsdyrskallet inneholder ikke DNA (Stevenson, 1985). Så selv om pelleten inneholder byttedyrrester, kan den være tom for byttedyr-DNA.

Det tredje forhold gjelder kannibal-problemet. Fekalpelleter hos copepoder kan inneholde DNA fra pelletprodusenten (Suzuki et al., 2000). *P. norvegica* er kannibal (Fleddum, 1999). I tilfeller der *P. norvegica* har spist artsfrender, vil pelletene inneholde bytte-DNA fra en art som man ikke kan utforme en artsspesifikk primer for som skiller mellom DNA fra byttet og DNA fra konsumenten (pelletprodusenten). Dette var ikke noe problem i denne oppgaven hvor det kun ble testet om pelleten inneholdt *C. helgolandicus*-DNA, men kan være et problem i senere studier hvis man ønsker å teste for flere byttedyr-arter og oppnå en mer kvantitativ tilnærming til *P. norvegicus* fødepreferanser.

4.3.2 Kvantitative forhold

Artsspesifikk PCR detekterer hvor mange av pelletene som inneholder DNA fra målararten. Dette betyr nødvendigvis ikke at dette antallet av byttet har blitt spist. Det er tidligere vist å være god korrelasjon mellom pelletproduksjon og fødeinntak, men forholdstallet varierer (Olsen et al., 2000; Tiselius og Jonsson, 1997). En pellet kan inneholde rester (og DNA) fra mer enn ett bytte, Båmstedt og Holt (1978) observerte at *P. norvegica* ofte bare spiste deler av byttet. Forholdstallet mellom pelletproduksjon og fødeinntak antas også å påvirkes av type bytte spist (Båmstedt og Holt, 1978). Fekalpelletter består av ufordøyde rester. Det er rimelig å anta at *P. norvegica* er i stand til å fordøye for eksempel bløtdyrarver i større grad enn voksne krepsdyr med kitinholdig skall (Mayzaud, 1986). Tidligere studier har vist at fekalpelletter for det meste inneholdt copepode-rester (Fleddum et al., 2001), mens mageanalyser har vist at copepoder selv om det er viktigste bytte, bare utgjorde 20% av dietten (Ottesen, 1995). Å analysere fekalpelletter i motsetning til mageinnhold, kan derfor tenkes å gi et skjevt bilde av hva som er det viktigste byttedyret med uforholdsvis stor vekt på byttedyr med mange harde deler. Det er i tillegg et problem ved artsspesifikk PCR å påvise hvem som har spist hvem. Metoden beskrevet i dette studiet påviser *C. helgolandicus*-DNA, men det behøver ikke være *P. norvegica* som har spist *Calanus*, det kan for eksempel være byttet (av en annen art) som igjen har konsumert denne copepodearten. Men DNA fra byttet til byttet har i såfall gått igjennom to tarmsystemer og antas i de fleste tilfeller å være så defragmentert at det ikke vil utgjøre noen stor feilkilde (Mayzaud, 1986).

4.3.3 Alignmentet og cytochrome oxidase-c subunit I

Alignmentet viste stor variasjon i cytochrome oxidase-c subunit I (COI) både mellom og innen arter. Det kan ikke utelukkes at noe av variasjonen i alignmentet ikke var reell. Dette kan komme av feil i sekvensene som er sendt til databasene på grunn av sekvenseringsfeil, PCR-feil og slurvefeil ved databearbeidelsen, noe som er påpekt å være et problem i flere genetiske studier (Andrews et al., 1999; Dennis, 2003; Forster, 2003). Noe variasjon kan også skyldes forekomst av pseudogener (Bucklin et al., 1999). Ytterligere sekvensering i tillegg til undersøkelse av proteinene er derfor nødvendig for å verifisere både sekvensene fra databasen og egne sekvenser. Men den store variasjonen i nukleotider som ble funnet, er i samsvar med tidligere genetiske studier på calanoide copepoder som også er gjort på andre områder enn COI (Braga et al., 1999; Bucklin et al., 2000a; Bucklin et al., 1998; Bucklin et al., 1999; Hill et al., 2001; Kiesling et al., 2002). Dette kan tyde på at disse artene, selv om de er

morfologisk like, er svært gamle. Men da de lever i et miljø som fordrer liten variasjon i utseende, utvikles få morfologiske forskjeller (Verity og Smetacek, 1996).

4.3.4 Utforming av artsspesifikke primere

Tre ulike COI-primere ble testet for art/gruppespesifisitet i dette studiet, og bare én (COI-2026) viste seg å være spesifikk nok. Spesifikke primere fungerer bare dersom de ved tilstedeværelse av templat-DNA fra målorganismen konsekvent amplifiserer et produkt av forventet størrelse. For å være artsspesifikke, må de i tillegg ikke gi amplifikasjonsprodukt når DNA fra målorganismen ikke forekommer. I naturlige økosystemer finnes en rekke arter sammen. Derfor er det viktig å undersøke hvordan primeren for målorganismen fungerer ved tilstedeværelse av bakgrunns-DNA.

COI-1578 : Primeren COI-1578, utviklet av Bucklin et al. (1999) ga falske positive resultater under betingelsene oppgitt av Bucklin et al. (1999) og under modifiserte betingelser. Denne primeren var bare ulik *P. norvegica*-sekvensen i den fjerde siste basen i 3' enden. Dette var ikke tilstrekkelig til at primeren diskriminerte mellom *C. helgolandicus* og *P. norvegica* under reaksjonsforholdene benyttet, selv om én unik base hos målorganismen i teorien kan være nok for artsspesifikk PCR (Hare et al., 2000). Primeren COI-1578 kan allikevel godt fungere som en "artsspesifikk" *C. helgolandicus*-primer til å skille ulike *Calanus* spp. fra hverandre i en multiplex PCR (det vil si en PCR med mer enn to primere) med templat-DNA fra kun en *Calanus* sp. til stede som beskrevet av Bucklin et al. (1999).

COI-1875: Primeren COI-1875 ga også falske positive resultater selv under strenge reaksjonsforhold og var derfor ikke egnet som artsspesifikk *Calanus helgolandicus*-primer. Dette til tross for at hele 4 baser (22%) var forskjellige mellom *C. helgolandicus* og *P. norvegica* i området der primeren skulle binde seg og to av baseforskjellene var i 3' enden. Dette kan ikke bortforklares med feilbinding på grunn av basen T som binder seg relativt bra med alle de fire nukleotidene (Palumbi, 1996), da det var forskjeller i basekombinasjoner uten T. Heller ikke ved at primeren bandt seg et annet sted innenfor COI, da PCR-produktet for de falske positive prøvene var av samme lengde som for *C. helgolandicus*-prøvene. En mulig årsak er feil i alignmentet, forøvrig er kryssreagering (crossreactivity) hos prober ikke noe uvanlig fenomen (Hare et al., 2000; Rudi et al., 2000).

Bruk av to spesifikke primere i stedet for en spesifikk primer sammen med en universell er vist å gi større grad av spesifisitet (Rocha-Olivares, 1998), og COI-1875 kan muligens tenkes

å egne seg som den ene av to artsspesifikke *C. helgolandicus*-primere. Men i tilfeller der man ønsker å teste for mer enn en byttedyrart, blir det fort litt mange teoretiske kombinasjonsmuligheter hvis man skal kjøre en multiplex PCR-reaksjon.

COI-2026: Alle *P. norvegica*-sekvensene i alignmentet var identiske i området der primeren COI-2026 skulle binde seg og 5 basepar (25%) i denne sekvensdelen var forskjellige fra primeren. To av disse avvikende basene var blant de fire siste i 3' enden. Allikevel var ikke dette nok til at primeren diskriminerte mellom *C. helgolandicus* og *P. norvegica* ved vanlig PCR og touch down-PCR med høye annealingtemperaturer var nødvendig. Ved bruk av touch down-PCR fungerte COI-2026 sammen med HCO-2198-primeren som artsspesifikk *C. helgolandicus*-primer. Primeren er artsspesifikk fordi den ikke ga falske positive resultater når den ble testet mot 6 andre potensielle byttedyr til *P. norvegica* i Oslofjorden. I tillegg til at ingen andre zooplanktonsekvenser enn *C. helgolandicus*-COI kom opp ved BLAST-søk på primeren. Primeren har imidlertid ikke blitt testet eksperimentelt mot alle andre zooplanktonarter. Primeren kan være artsspesifikk også utenfor det undersøkte geografiske området, men ytterligere studier er påkrevd for å verifisere dette.

4.3.5 Framtidige perspektiver

Fekalpelletter ble i dette studiet vist å inneholde intakt byttedyr-DNA. Pelletene ble analysert ved bruk av nested, artsspesifikk PCR. Denne metoden viste seg å fungere, den var kostnadseffektiv og lettvind å utføre. De positive resultatene ble verifisert ved direkte sekvensering av PCR-produktet.

Det er mulig man i framtidige undersøkelser ikke vil trenge å kjøre nested PCR. Verken Hill et al. (2001) eller Hare et al. (2000), som brukte artsspesifikk PCR til å identifisere henholdsvis søsterarter av *Calanus* og bløtdyr larver, gjorde bruk av nested PCR, men kjørte templat-DNAet kun gjennom én multiplex PCR reaksjon med artsspesifikke primere. Dette kan tenkes å være tilstrekkelig også for pellet-DNA, selv om enkelte pelletter som ikke ga synlige bånd på gel etter PCR med universelle primere, ga synlige bånd etter en ny PCR med artsspesifikke primere.

Det finnes andre molekylære metoder enn artsspesifikk PCR som har vært brukt for å artsbestemme zooplankton. En er oppformering av DNA ved hjelp av universelle primere etterfulgt av RFLP-analyse (restriction fragment length polymorphism-analyse) (f.eks. Lindstrom (1999) og Lindeque et al. (1999)). RFLP baserer seg på bruk av

restriksjonsenzymmer som kutter PCR-produktet ved bestemte baserekkefølger som antas å finnes i forskjellig antall og på forskjellige steder i DNAet hos de ulike artene. De forskjellige artene kan identifiseres ved at de gir opphav til ulike båndmønstre ved elektroforese. Resultatene kan verifiseres ved at hele PCR-produktet eller enkelte av fragmentene sekvenseres. Metoden har vist seg å fungere til å skille ulike *Calanus*-arter når enkeltindivider ble brukt som templat-DNA (Lindeque et al., 1999), men ved bruk av urene DNA-templater som pelleter (som kan tenkes å inneholde DNA fra flere arter), vil den muligens ikke egne seg.

En annen metode, bruk av merkete prober, antas som mer lovende. DNA oppformerer ved hjelp av universelle, merkete primere (primerne kan for eksempel være merket med biotin (Kiesling et al., 2002)) og etterfølges av hybridisering med artsspesifikke prober. Man kan så direkte påvise om PCR-produktet binder seg til proben eller ikke. Denne metoden har vært brukt til å artsbestemme ulike calanoide copepoder som forekom i Floridabukta (Kiesling et al., 2002). Metoden kan godt tenkes også å fungere på pelleter. Men det vil ikke være mulig å verifisere positive resultater ved hjelp av sekvensering av PCR-produktet uten for eksempel foregående kloning når templat-DNA er en uren pellet. Det er også utviklet metoder hvor det er den artsspesifikke proben som er merket, og denne kan introduseres direkte i pelleten uten foregående PCR, som for eksempel ved bruk av fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) (FISH se Schonhuber et al. (1999)). Verifisering vil kunne gjøres i mikroskop (lysmikroskop eller elektronmikroskop) eller i Laser Scanner Cytometer.

Uansett har artsspesifikke molekulære prober potensiale til å være nyttige i framtidige studier hvor det er ønskelig å identifisere konsumert bytte hos karnivore copepoder, uavhengig om de brukes som primere i artsspesifikk PCR eller som i en av de andre metodene beskrevet over. Ved utvikling av flere artsspesifikke prober, vil disse kunne brukes i mer utførlige undersøkelser av fødesammensetningen. Ved å gi muligheten til raskt å få svar på hva pelleter fra hundreder av copepoder inneholder, kan de for eksempel benyttes til å avdekke hittil uklare predator-bytte-interaksjoner, slik som små copepoders predasjon på copepodeegg og nauplier (eks. Lampitt, 1978), taktile predatorers effektivitet overfor *Calanus* i diapause (eks. Yen, 1987; Olsen et al., 2000), eller i hvilken grad "herbivore" arter også spiser dyreplankton (eks. Ohman og Hirche, 2001). Artsspesifikke copepode-prober kan dessuten vise seg å kunne være artsspesifikke overfor andre byttedyrgrupper og predatorer, slik at de vil kunne brukes i undersøkelse av fødesammensetningen hos alt fra krill til fisk og fugl. Ved å være et

hjelpemiddel som muliggjør artsbestemming av fragmenterte biter uten morfologiske kjennetegn, har artspesifikke prober her et stort potensiale.

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å beskrive og forklare vertikalfordeling hos den karnivore copepoden *Pareuchaeta norvegica* i lys av fysiologisk status og avveiningen mellom fødetilgang og predasjonsfare. I tillegg var det ønskelig å utprøve i hvilken grad artsspesifikk PCR kunne brukes til å bestemme fødesammensetning basert på analyse av fekalpelleter.

Dyrenes vertikalfordeling ble kartlagt ved hjelp av håvtrekk. Innsamlingen foregikk på en 200 m dyp lokalitet i Drøbakssundet, Oslofjorden i løpet av to døgntokt vår og høst 2002. For å få oversikt over dyrenes kondisjon, ble individenes prosomlengde, tørrvekt og størrelse av fettsekken målt. Fødeaktiviteten ble beregnet ved å måle produksjonen av fekalpelleter fra dyr fanget i ulike dyp. Fordelingen av potensielle byttedyr ble også undersøkt ved hjelp av håvtrekk.

Pareuchaeta norvegica forekom i størst antall under 150 m både vår og høst. Det var ingen markert forskjell i veid middeldyp mellom dag og natt. Umodne hunner hadde en grunnere fordeling enn modnende hunner og hunner med eggpakke. Juvenile befant seg høyere i vannsøyla enn voksne. Det var til dels stor individuell variasjon i tørrvekt, lengde og volum av fettsekken både vår og høst, også mellom dyr fanget i samme dybdeintervall. Det var likevel en klar trend at de voksne individene som befant seg i den øvre delen i vannsøyla hadde kortere prosom, lavere tørrvekt, lavere tørrvekt/lengde-forhold, samt mindre fettsekk enn dem som oppholdt seg lengre ned. Individene fanget høyt i vannsøyla ble observert å være mindre pigmentert enn individene fanget dypere.

Pelletproduksjonen var gjennomgående liten, og de fleste individene produserte ikke peller, verken vår eller høst. Det var til dels stor variasjon i antall peller produsert innen ett og samme dybdeintervall. Det var allikevel forskjell i antall med hensyn på dyp om høsten med høyere pelletproduksjon hos gruntlevende individer. Tettheten av potensielle byttedyr for *P. norvegica* var også høyest i vannsøylas øvre del.

De molekylære undersøkelsene viste at fekalpelleter kan inneholde nok intakt bytte-DNA til at det kan amplifiseres ved bruk av artsspesifikk PCR. En individuell pellet var tilstrekkelig for å få amplifikasjonsprodukt som kunne påvises ved agarosegel-elektroforese. En artsspesifikk primer for *Calanus helgolandicus* ble utviklet og testet.

Referanser

- Aksnes, D.L. og Blindheim, J., 1996. Circulation patterns in the North Atlantic and possible impact on population dynamics of *Calanus finmarchicus*. *Ophelia*, 44: 7-28.
- Andersen, T., Beyer, F. og Föyn, E., 1970. Hydrography of the Oslofjord. Report on The Study Course in Chemical Oceanography arranged in 1969 by ICES with support of UNESCO, 61 s.
- Andrews, R.M. et al., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23: 147.
- Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, 511 s.
- Bagøien, E., Kaartvedt, S., Aksnes, D.L. og Eiane, K., 2001. Vertical distribution and mortality of overwintering *Calanus*. *Limnology and Oceanography*, 46(6): 1494-1510.
- Bagøien, E., Kaartvedt, S. og Øverås, S., 2000. Seasonal vertical migrations of *Calanus* spp. in Oslofjorden. *Sarsia*, 85(4): 299-311.
- Bailey, K.M. og Yen, J., 1983. Predation by a Carnivorous Marine Copepod, *Euchaeta elongata* Esterly, on Eggs and Larvae of the Pacific Hake, *Merluccius productus*. *Journal of Plankton Research*, 5(1): 71-82.
- Bakke, J.L.W., 1977. Ecological studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Population dynamics of *Euchaeta norvegica*, (Crustacea, Copepoda) from 1971 to 1974. *Sarsia*, 63(1): 49-54.
- Bathmann, U.V., Noji, T. og VonBodungen, B., 1990. Copepod grazing potential in late winter in the Norwegian sea - A factor in the control of spring phytoplankton growth. *Marine Ecology-Progress Series*, 60(3): 225-233.
- Batty, R.S., Blaxter, J.H.S. og Richard, J.M., 1990. Light-Intensity and the Feeding-Behavior of Herring, *Clupea harengus*. *Marine Biology*, 107(3): 383-388.
- Blades-Eckelbarger, P.I., 1991. Comparative Ultrastructure of Lipid Storage Sites in Female *Euchaeta marina* and *Pleuromamma xiphias* (Copepoda, Calanoida). *Marine Biology*, 108(1): 49-58.
- Bollens, S.M. og Frost, B.W., 1991a. Diel Vertical Migration in Zooplankton - Rapid Individual- Response to Predators. *Journal of Plankton Research*, 13(6): 1359-1365.
- Bollens, S.M. og Frost, B.W., 1991b. Ovigerity, Selective Predation, and Variable Diel Vertical Migration in *Euchaeta elongata* (Copepoda, Calanoida). *Oecologia*, 87(2): 155-161.
- Bollens, S.M., Frost, B.W., Thoreson, D.S. og Watts, S.J., 1992. Diel Vertical Migration in Zooplankton - Field Evidence in Support of the Predator Avoidance Hypothesis. *Hydrobiologia*, 234(1): 33-39.
- Braga, E., Zardoya, R., Meyer, A. og Yen, J., 1999. Mitochondrial and nuclear rRNA based copepod phylogeny with emphasis on the Euchaetidae (Calanoida). *Marine Biology*, 133(1): 79-90.
- Brooks, J.L. og Dodson, S.I., 1965. Predation body size and composition of plankton. *Science*, 150: 28-35.

- Brown, W.M., 1985. The mitochondrial genome of animals. Molecular Evolutionary Genetics New York: Plenum Press: 95-130.
- Braarud, T. og Ruud, J.T., 1937. The hydrographic conditions and aeration of the Oslofjord 1933-1934. Hvalrådets skrifter, 15: 5-43.
- Bucklin, A. et al., 2000a. Population genetic variation of *Calanus finmarchicus* in Icelandic waters: preliminary evidence of genetic differences between Atlantic and Arctic populations. Ices Journal of Marine Science, 57(6): 1592-1604.
- Bucklin, A., Bentley, A.M. og Franzen, S.P., 1998. Distribution and relative abundance of *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda: Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. Marine Biology, 132(1): 97-106.
- Bucklin, A., Frost, B.W., Bradford-Grieve, J., Allen, L.D. og Copley, N.J., 2003. Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. Marine Biology, 142(2): 333-343.
- Bucklin, A., Frost, B.W. og Kocher, T.D., 1995. Molecular Systematics of 6 *Calanus* and 3 *Metridia* Species (Calanoida, Copepoda). Marine Biology, 121(4): 655-664.
- Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R.S., Bentley, A.M. og Kaartvedt, S., 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation og competitive, species-specific PCR. Hydrobiologia, 401: 239-254.
- Bucklin, A., Kaartvedt, S., Guarnieri, M. og Goswami, U., 2000b. Population genetics of drifting (*Calanus* spp.) and resident (*Acartia clausi*) plankton in Norwegian fjords. Journal of Plankton Research, 22(7): 1237-1251.
- Burton, R. og Lee, B., 1994. Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies and Allozyme Polymorphism Across a Major Phylogeographic Break in the Copepod *Tigriopus californicus*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 91: 5197-5201.
- Båmstedt, U. og Matthews, J.B.L., 1975. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. The weight and biochemical composition of *Euchaeta norvegica* in relation to life cycle. In: Barnes H (ed) Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp. Aberd. Univ. Press, s 311-327.
- Båmstedt, U., 1975. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Ecological aspects of individual variations in weight and protein and lipid content of *Euchaeta norvegica* (Copepoda). Sarsia, 59: 31-46.
- Båmstedt, U., 1979. Reproductive bioenergetics within the summer and winter generations of *Euchaeta norvegica* (Copepoda). Marine Biology, 54: 135-42.
- Båmstedt, U. og Holt, M.R., 1978. Experimental studies on deep-water pelagic community of Western Norway. Prey-size preference and feeding of *Euchaeta norvegica* (Copepoda). Sarsia, 63(4): 225-236.
- Båmstedt, U. og Skjoldal, H.R., 1976. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Euchaeta norvegica* (copepoda) in relation to its life cycle. Sarsia, 60: 63-80.
- Checkley, D.M., 1982. Selective Feeding by Atlantic Herring (*Clupea harengus*) Larvae on Zooplankton in Natural Assemblages. Marine Ecology-Progress Series, 9(3): 245-253.

- Clary, D.O. og Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial-DNA-molecule of *Drosophila yakuba*-nucleotide-sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3): 252-271.
- Cushing, D., 1975. *Marine Ecology and Fisheries*. Cambridge University Press, London, 278 s.
- Dale, T., Bagøien, E., Melle, W. og Kaartvedt, S., 1999. Can predator avoidance explain varying overwintering depth of *Calanus* in different oceanic water masses? *Marine Ecology-Progress Series*, 179: 113-121.
- Dawidowicz, P. og Loose, C.J., 1992. Metabolic Costs During Predator-Induced Diel Vertical Migration of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 37(8): 1589-1595.
- Dennis, C., 2003. Error reports threaten to unravel databases of mitochondrial DNA. *Nature*, 421: 773-774.
- Dodson, S., 1990. Predicting diel vertical migration of zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 35: 1195-1200.
- Dussart, B.H. og Defaye, D., 1995. *Copepoda: Introduction to the Copepoda*. SPB Academic Press Publishing, Amsterdam, 277 s.
- Eiane, K., Aksnes, D.L., Ohman, M.D., Wood, S. og Martinussen, M.B., 2002. Stage-specific mortality of *Calanus* spp. under different predation regimes. *Limnology and Oceanography*, 47(3): 636-645.
- Enckell, P.H., 1980. *Kräftdjur*. Signum i Lund, Lund, 685 s.
- Fiksen, O. og Carlotti, F., 1998. A model of optimal life history and Diel vertical migration in *Calanus finmarchicus*. *Sarsia*, 83: 129-147.
- Fisher, L.R., Kon, S.K. og Thompson, S.Y., 1952. Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. I. Marine Crustacea. *J.mar biol Ass UK*, 31: 229-258.
- Fleddum, A., 1999. Fordeling og fødeaktivitet hos *Euchaeta norvegica* og *E. glacialis* i Norskehavet om sommeren. Cand. scient Thesis, Universitetet i Oslo, 68 s.
- Fleddum, A., Kaartvedt, S. og Ellertsen, B., 2001. Distribution and feeding of the carnivorous copepod *Paraeuchaeta norvegica* in habitats of shallow prey assemblages and midnight sun. *Marine Biology*, 139(4): 719-726.
- Flemminger, A. og Hulsemann, K., 1977. Geographical range and taxonomic divergence in North Atlantic *Calanus* (*C. helgolandicus*, *C. finmarchicus* and *C. glacialis*). *Marine Biology*, 40: 233-248.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. og Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I form diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Forster, P., 2003. To Err is Human. *Annals of Human Genetics*, 67: 2-4.
- Frost, B.W., 1988. Variability and Possible Adaptive Significance of Diel Vertical Migration in *Calanus pacificus*, a Planktonic Marine Copepod. *Bulletin of Marine Science*, 43(3): 675-694.
- Gade, H.G., 1968. Horizontal and vertical exchanges and diffusion in water masses of Oslo fjord. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 17(1-4): 462-475.
- Gibbons, M.J., 1993. Vertical migration and feeding of *Euphasia lucens* at 2 72-H stations in the southern Benguela upwelling region. *Marine Biology*, 116: 257-268.

- Giske, J. og Aksnes, D.L., 1992. Ontogeny, season and trade-offs: Vertical distribution of the mesopelagic fish *Maurolicus muelleri*. *Sarsia*, 77: 253-261.
- Gliwicz, M.Z., 1986. Predation and the Evolution of Vertical Migration in Zooplankton. *Nature*, 320(6064): 746-748.
- Goodson, M.S., Giske, J. og Rosland, R., 1995. Growth and ovarian development of *Maurolicus muelleri* during spring. *Marine Biology*, 124: 185-195.
- Hairston, N.G., Walton, W.E. og Li, K.T., 1983. The causes and consequences of sex-specific mortality in a freshwater copepod. *Limnology and Oceanography*, 28(5): 935-947.
- Harding, G., 1974. The food of deep sea copepods. *J.mar biol Ass UK*, 54: 141-155.
- Hare, M.P., Palumbi, S.R. og Butman, C.A., 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Marine Biology*, 137(5-6): 953-961.
- Hays, G.C., 1995. Ontogenetic and seasonal variation in the diel vertical migration of the copepods *Metridia lucens* and *Metridia longa*. *Limnology and Oceanography*, 40(8): 1461-1465.
- Hays, G.C., 1996. Large-scale patterns of diel vertical migration in the north Atlantic. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 43(10): 1601-1615.
- Hays, G.C., Harris, R.P. og Head, R.N., 2001a. Diel changes in the near-surface biomass of zooplankton and the carbon content of vertical migrants. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 48(4-5): 1063-1068.
- Hays, G.C., Kennedy, H. og Frost, B.W., 2001b. Individual variability in diel vertical migration of a marine copepod: Why some individuals remain at depth when others migrate. *Limnology and Oceanography*, 46(8): 2050-2054.
- Hays, G.C., Proctor, C.A., John, A.W.G. og Warner, A.J., 1994. Interspecific Differences in the Diel Vertical Migration of Marine Copepods - the Implications of Size, Color, and Morphology. *Limnology and Oceanography*, 39(7): 1621-1629.
- Hays, G.C., Webb, P.I. og Frears, S.L., 1998. Diel changes in the carbon and nitrogen content of the copepod *Metridia lucens*. *Journal of Plankton Research*, 20(4): 727-737.
- Hill, R.S., Allen, L.D. og Bucklin, A., 2001. Multiplexed species-specific PCR protocol to discriminate four N. Atlantic *Calanus* species, with an mtCOI gene tree for ten *Calanus* species. *Marine Biology*, 139(2): 279-287.
- Hopkins, C.C.E., 1982. The Breeding Biology of *Euchaeta norvegica* (Boeck) (Copepoda, Calanoida) in Loch Etive, Scotland - Assessment of Breeding Intensity in Terms of Seasonal Cycles in the Sex-Ratio, Spermatophore Attachment, and Egg-Sac Production. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 60(1): 91-102.
- James, A.G. og Findlay, K.P., 1989. Effect of Particle-Size and Concentration on Feeding-Behavior, Selectivity and Rates of Food Ingestion by the Cape Anchovy *Engraulis-Capensis*. *Marine Ecology-Progress Series*, 50(3): 275-294.
- Jaschnov, W.A., 1972. On the systematic status of *Calanus glacialis*, *Calanus finmarchicus* and *Calanus helgolandicus*. *Crustaceana*, 22: 279-284.
- Kerfoot, W., 1985. Adaptive value of vertical migration: Comments on the predation hypothesis and some alternatives. *Contributions in Marine Science*, 27: 91-113.

- Kiesling, T.L. et al., 2002. Rapid identification of adult and naupliar stages of copepods using DNA hybridization methodology. *Marine Biotechnology*, 4(1): 30-39.
- Kaartvedt, S., Dale, T., Bagøien, E. og Viken, T., 2002. Bi-modal vertical distribution of the carnivorous copepod *Paraeuchaeta norvegica*. *Journal of Plankton Research*, 24(2): 155-158.
- Lampert, W., 1989. The Adaptive Significance of Diel Vertical Migration of Zooplankton. *Functional Ecology*, 3(1): 21-27.
- Lampitt, R.S., 1978. Carnivorous feeding by a small marine copepod. *Limnology and Oceanography*, 23: 1228-1231.
- Lampitt, R.S., Noji, T. og Von Bodungen, B., 1990. What happens to zooplankton fecal pellets - Implications for material flux. *Marine Biology*, 104: 15-23.
- Lindeque, P.K., R. P. Harris, R.P., Jones, M.B. og Smerdon, G.R., 1999. Simple molecular method to distinguish the identity of *Calanus* species (Copepoda: Calanoida) at any developmental stage. *Marine Biology*, 133(1): 91-96.
- Lindstrom, D.P., 1999. Molecular species identification of newly hatched Hawaiian amphidromous gobioid larvae. *Marine Biotechnology*, 1(2): 167-174.
- Lomnicki, A., 1980. Regulation of population-density due to individual-differences and patchy environment. *Oikos*, 35: 185-193.
- Longhurst, A.R. og Williams, R., 1979. Materials for plankton modelling: Vertical distribution of Atlantic zooplankton in summer. *Journal of Plankton Research*, 1: 1-28.
- Lowndes, A.G., 1935. The swimming and feeding of certain calanoid copepods. *Prc. Zool. Soc. Lond.*: 687-715.
- Mauchline, J., 1992. Restriction of Body Size Spectra within Species of Deep-Sea Plankton. *Marine Ecology-Progress Series*, 90(1): 1-8.
- Mauchline, J., 1994. Seasonal-Variation in Some Population Parameters of *Euchaeta* Species (Copepoda, Calanoida). *Marine Biology*, 120(4): 561-570.
- Mauchline, J., 1995. Bathymetric Adaptations of Life-History Patterns of Congeneric Species (*Euchaeta*, Calanoida) in a 2000 M Water Column. *Ices Journal of Marine Science*, 52(3-4): 511-516.
- Mayzaud, P., 1986. Digestive enzymes and their relation to nutrition. In: E.D.S. Corner and S.C.M. O'Hara (Editors), *The Biological Chemistry of Marine Copepods*. Clarendon Press, Oxford.
- Miller, C.B., Morgan, C.A., Prahl, F.G. og Sparrow, M.A., 1998. Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography*, 43(3): 488-497.
- Motoda, S., 1959. Devices of simple plankton apparatus. *Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 7: 73-94.
- Nemoto, T., Mauchline, J. og Kamada, K., 1976. Brood Size and Chemical Composition of *Paraeuchaeta norvegica* (Crustacea-Copepoda) in Loch Etive, Scotland. *Marine Biology*, 36(2): 151-157.
- O'Brien, W.J., 1987. Planktivory by freshwater fish: Thrust and parry in the pelagia. In: W. Kerfoot og A. Sih (Editors), *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, New England, s 3-16.

- Ohman, M.D., 1990. The demographic benefits of diel vertical migration by zooplankton. *Ecological Monographs*, 60(3): 257-281.
- Ohman, M.D., Frost, B.W. og Cohen, E.B., 1983. Reverse Diel Vertical Migration - an Escape from Invertebrate Predators. *Science*, 220(4604): 1404-1407.
- Ohman, M.D. og Hirche, H.J., 2001. Density-dependent mortality of an oceanic copepod population. *Nature*, 412: 638-641.
- Olsen, E.M., Jørstad, T. og Kaartvedt, S., 2000. The feeding strategies of two large marine copepods. *Journal of Plankton Research*, 22(8): 1513-1528.
- Ottesen, G.O., 1995. Næringsøkologi hos to predatorerende copepoder, *Chiridius armatus* (Boeck) og *Euchaeta norvegica* (Boeck), i nordnorske farvann. Marine biology Thesis, Norges Fiskerihøgskole, Universitet i Tromsø, 90 s.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: D.M. Hillis, C. Moritz og B.K. Mable (Editors), *Molecular systematics* 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, s 205-246.
- Park, T., 1994. Geographic-Distribution of the Bathypelagic Genus *Paraeuchaeta* (Copepoda, Calanoida). *Hydrobiologia*, 293: 317-332.
- Pearre, S.J., 1979. Problems of detection and interpretation of vertical migration. *Journal of Plankton Research*, 1(1): 29-44.
- Pedersen, B.V., 1996. A Phylogenetic Analysis of Cuckoo Bumblebees (*Psithyrus*, Lepeletier) and Bumblebees (*Bombus*, Latreille) Inferred from Sequences of the Mitochondrial Gene Cytochrome Oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 289-297.
- Reppe, B., 1986. Hydroacoustic assessment and ecology of krill stocks in the inner Oslofjord. Cand. scient Thesis, Oslo, Oslo, 66 s.
- Rocha-Olivares, A., 1998. Multiplex haplotype-specific PCR: a new approach for species identification of the early life stages of rockfishes of the species-rich genus *Sebastes* Cuvier. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 231(2): 279-290.
- Roe, H.S.J. et al., 1984. The Diel Migrations and Distributions within a Mesopelagic Community in the Northeast Atlantic. 1.Introduction and Sampling Procedures. *Progress in Oceanography*, 13(3-4): 245-268.
- Rudi, K., Skulberg, O.M., Skulberg, R. og Jakobsen, K.S., 2000. Application of Sequence-Specific Labeled 16S rRNA Gene Oligonucleotide Probes for Genetic Profiling of Cyanobacterial Abundance and Diversity by Array Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 4004-4011.
- Sambrook, J. og Russel, D.W., 2001. Protocol 2: Detection of DNA in Agarose Gels, *Molecular cloning: a laboratory manual* / James Sambrook, David W Russel. - 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3 bind: ill.
- Sandström, O., 1980. Selective Feeding by Baltic Herring. *Hydrobiologia*, 69(3): 199-207.
- Sargent, J.R., Gatten, R.R. og McIntosh, R., 1974. Biosynthesis of wax esters in cell-free preparations of *Euchaeta norvegica*. *Comp Biochem Physiol B*, 47(1): 217-27.
- Sars, G.O., 1903. Copepoda; Calanoida. An account of the Crustacea of Norway with short descriptions and figures of all the species, 171 s.

- Schonhuber, W. et al., 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1259-1267.
- Sekino, T. og Yamamura, N., 1999. Diel vertical migration of zooplankton: optimum migrating schedule based on energy accumulation. *Evolutionary Ecology*, 13(3): 267-282.
- Shuert, P.G. og Hopkins, T.L., 1987. The Vertical-Distribution and Feeding Ecology of *Euchaeta marina* in the Eastern Gulf of Mexico. *Contributions in Marine Science*, 30: 49-61.
- Simard, Y., Lacroix, G. og Legendre, L., 1985. Insitu twilight grazing rythm during diel vertical migration of a scattering layer of *Calanus finmarchicus*. *Limnology and Oceanography*, 30(3): 598-606.
- Skarra, H., 1999. Vertikalfordeling og fødeinntak hos den carnivore copepoden *Euchaeta norvegica* i Oslofjorden, Universitetet i Oslo, 51 s.
- Skarra, H. og Kaartvedt, S., 2003. Vertical distribution and feeding of carnivorous copepod *Paraeuchaeta norvegica*. *Marine Ecology-Progress Series*, 249: 215-222.
- Stevenson, J.R., 1985. Dynamics of the Integument. In: D.E. Bliss og L.H. Mantel (Editors), *The Biology of Crustacea: Integument, Pigments and Hormonal Processes*. Academic Press, Inc., New York, s 2-32.
- Suzuki, H., Tamate, B.H. og Sasaki, H., 2000. Identification of fecal pellets producers through copepod-derived DNA sequence. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 47(2): 136-139.
- Tiselius, P. og Jonsson, P.R., 1997. Effects of copepod foraging behavior on predation risk: An experimental study of the predatory copepod *Pareuchaeta norvegica* feeding on *Acartia clausi* and *A. tonsa* (Copepoda). *Limnology and Oceanography*, 42(1): 164-170.
- Venables, W.N. og Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York, 495 s.
- Verity, P. og Smetacek, V., 1996. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 130: 277-293.
- Viken, T., 1995. Zooplanktonsamfunnet vinterstid i Lurefjorden: Sammensetning, vertikalfordeling og døgnvandring. Cand. scient Thesis, Universitetet i Oslo, 61 s.
- Vuorinen, I., Rajasilta, M. og Salo, J., 1983. Selective Predation and Habitat Shift in a Copepod Species - Support for the Predation Hypothesis. *Oecologia*, 59(1): 62-64.
- Wiborg, K.F., 1940. The production of zooplankton in the Oslo-Fjord 1933-34. *Hvalrådets skrifter*, 21.
- Wiborg, K.F., 1954. Investigation on the zooplankton in costal and offshore water of western and north-western Norway with special reference to the copepods. *Fiskeridirektoratets skrifter, serie Havundersøkelser*, 11: 1-66.
- Winfield, I.J. og Townsend, C.R., 1983. The cost of reproduction: increased susceptibility to fish predation. *Oecologia*: 406-411.
- Yen, J., 1982. Sources of Variability in Attack Rates of *Euchaeta elongata* Esterly, a Carnivorous Marine Copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 63(2): 105-117.

- Yen, J., 1983. Effects of Prey Concentration, Prey Size, Predator Life Stage, Predator Starvation, and Season on Predation Rates of the Carnivorous Copepod *Euchaeta elongata*. *Marine Biology*, 75(1): 69-77.
- Yen, J., 1985a. Selective Predation by the Carnivorous Marine Copepod *Euchaeta elongata* - Laboratory Measurements of Predation Rates Verified by Field Observations of Temporal and Spatial Feeding Patterns. *Limnology and Oceanography*, 30(3): 577-597.
- Yen, J., 1985b. Vertical-Distribution and Migratory Activity of 3 Species of *Euchaeta*, a Carnivorous Marine Copepod. *Bulletin of Marine Science*, 37(2): 781-782.
- Yen, J., 1987. Predation by a Carnivorous Marine Copepod, *Euchaeta norvegica* Boeck, on Eggs and Larvae of the North-Atlantic Cod *Gadus morhua* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 112(3): 283-296.
- Yen, J., 1991. Predatory Feeding-Behavior of an Antarctic Marine Copepod, *Euchaeta antarctica*. *Polar Research*, 10(2): 433-442.
- Yen, J., Sanderson, B., Strickler, J.R. og Okubo, A., 1991. Feeding Currents and Energy-Dissipation by *Euchaeta rimana*, a Subtropical Pelagic Copepod. *Limnology and Oceanography*, 36(2): 362-369.
- Zaret, T.M. og Kerfoot, W., 1975. Fish predation on *Bosmina longirostris* - body-size selection versus visibility selection. *Ecology*, 56: 232-237.
- Zaret, T.M. og Suffern, J.S., 1976. Vertical migration in zooplankton as a predator avoidance mechanism. *Limnology and Oceanography*, 21(6): 804-813.
- Øresland, V., 1991. Feeding of the Carnivorous Copepod *Euchaeta antarctica* in Antarctic Waters. *Marine Ecology-Progress Series*, 78(1): 41-47.
- Øresland, V. og Ward, P., 1993. Summer and Winter Diet of 4 Carnivorous Copepod Species around South-Georgia. *Marine Ecology-Progress Series*, 98(1-2): 73-78.

Vedlegg

Vedlegg I: Cytochrome oxidase subunit I–nukleotidesequenser fra:

<i>Calanus helgolandicus</i> individ B5	egen sekvens	<i>M. lucens</i> individ NZea	AF 474107
<i>C. helgolandicus</i> individ AB cal 1	AF 332760	<i>M. lucens</i>	AF 531750
<i>C. helgolandicus</i> individ AB cal 2	AF 332761	<i>M. lucens</i> individ 50205	AF 513645
<i>C. helgolandicus</i> individ AB cal 3	AF 332762	<i>M. lucens</i>	AF 259666
<i>C. helgolandicus</i>	AF 259653	<i>M. pacfica</i>	AF 474108
<i>C. helgolandicus</i>	AF 242837	<i>M. pacfica</i>	AF 474109
<i>C. finmarchicus</i> slutt	AF 332767	<i>M. pacfica</i>	AF 513646
<i>C. finmarchicus</i> start	AF 242835	<i>M. gerlachei</i>	AF 531747
<i>C. glacialis</i>	AF 333039	<i>Heterorhabdus farrani</i>	AF 531745
<i>C. glacialis</i>	AF 259652	<i>Pseudocalanus elongatus</i>	AY 144467
<i>C. hyperboreus</i>	AF 259654	<i>P. minutus</i>	AF 332794
<i>C. hyperboreus</i>	AF 332770	<i>P. acuspes</i>	AF 462317
<i>C. pacificus</i>	AF 315013	<i>Paracalanus parvus</i>	AF 474110
<i>C. pacificus californicus</i>	AF 332763	<i>Ctenocalanus citer</i>	AF 332789
<i>C. pacificus oceanicus</i>	AF 332764	<i>Nannocalanus minor</i> type I	AF 332792
<i>C. australis</i>	AF 332766	<i>Mesocalanus tenuicornis</i>	AF 332788
<i>C. simillimus</i>	AF 332771	<i>Calanoides acutus</i>	AF 332791
<i>C. chilensis</i>	AF 332765	<i>Rhincalanus gigas</i>	AF 531746
<i>C. marshallae</i>	AF 332768	<i>Clausocalanus furcatus</i>	AF 332782
<i>C. sinicus</i>	AF 332769	<i>Neocalanus gracilis</i>	AY 144466
<i>Pareuchaeta norvegica</i> individ B11	egen sekvens	<i>Centropages hamutus</i>	AF 259663
<i>P. norvegica</i> individ C7	egen sekvens	<i>Acartia tonsa</i>	AF259662
<i>P. norvegica</i> individ C10	egen sekvens	(alle Copepoda, Calanoida)	
<i>P. norvegica</i>	AF 259668	<i>Oithona nana</i>	AF 259667
<i>P. antarctica</i>	AF 531748	(Copepoda, Cyclopoida)	
<i>P. biloba</i>	AF 531749		
<i>Euchaeta acutifrons</i>	AF 259664	<i>Trigriopus californicus</i>	AF 096952
<i>Chiridius armatus</i> individ B7	egen sekvens	(Copepoda, Harpacticoida)	
<i>C. armatus</i> individ B9	egen sekvens		
<i>Metridia lucens</i> individ NATl	AF 474106	<i>Drosophila yakuba</i>	X03240
		(Insecta)	

Nukleotide # 1 korresponderer til posisjon 1542 i den publiserte *Drosophila yakuba*-sekvensen (X03240) (Clary og Wolstenholme, 1985).